



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

## TESIS DOCTORAL

Mención "Doctorado Internacional"

---

# El papel de endoglina soluble en la fisiopatología de la preeclampsia

Memoria presentada por LUCÍA PÉREZ ROQUE  
para optar al Grado de Doctor  
por la Universidad de Salamanca.

Lucía Pérez Roque

*Salamanca, 30 de mayo de 2017*



LA DOCTORA D<sup>ÑA</sup>. MARÍA JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo, elaborado por D<sup>ña</sup>. Lucía Pérez Roque para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título "Papel de endogлина soluble en la fisiopatología de la preeclampsia", ha sido realizado bajo la dirección conjunta del Doctor D. José Miguel López Novoa y el Doctor D. Miguel Pericacho Bustos, en el Área de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado, en Salamanca, a 30 de mayo de 2017

Dra. D<sup>ña</sup>. María Jesús Monte Río



EL DOCTOR D. JOSÉ MIGUEL LÓPEZ NOVOA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, Y EL DOCTOR D. MIGUEL PERICACHO BUSTOS, PROFESOR AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo, titulado “Las isoformas de endoglina en la regulación de la angiogénesis”, presentado por Dña. Lucía Pérez Roque para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizado bajo su dirección en el Área de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y considerando que cumple las condiciones necesarias, lo consideran finalizado y autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado, en Salamanca, a 30 de mayo de 2017.

Dr. D. José Miguel López Novoa

Dr. D. Miguel Pericacho Bustos



Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con las siguientes ayudas:

- **Contrato de personal investigador en la Universidad de Salamanca** a cargo de la RED-IN-REN, dentro de las redes de excelencia del Instituto de Salud Carlos III.
  - **Ayuda para la Formación del Personal Investigador**, financiada por la Junta de Castilla y León. (PIRTU EDU/1084/2012)
-













---

# ÍNDICE

---

*"Empieza por el principio - dijo el Rey con gravedad -  
y sigue hasta llegar al final; allí te paras."*

*Alicia en el país de las Maravillas, Lewis Carroll*



<b>Índice.....</b>	<b>I</b>
Índice FIGURAS.....	X
Índice TABLAS.....	XIII
<b>Abreviaturas y Glosario.....</b>	<b>XV</b>
Abreviaturas.....	XVII
Glosario de términos en inglés.....	XXII
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
Preeclampsia.....	3
1. Clasificación.....	3
2. Factores de riesgo.....	5
3. Etiología.....	5
4. Prevención y Tratamiento.....	6
Placenta.....	7
1. Desarrollo y estructura de la placenta.....	8
2. Circulación placentaria.....	13
2.1. Remodelado de las arterias espirales.....	15
Placenta de ratones vs humanos.....	16
1. Zona fetal vs zona del laberinto.....	18
2. Envoltura citotrofoblástica vs zona basal.....	19
3. Zona materna de humanos vs zona materna de ratón.....	20
Alteraciones en preeclampsia.....	21

1. Defectos en placentación	21
1.1. Alteración en el remodelado de las arterias espirales	21
1.2. Hipoperfusión placentaria	24
2. Hipoxia placentaria	25
3. Estrés oxidativo	28
3.1. Oxisteroles	30
4. Inflamación	31
5. Disfunción endotelial	33
<b>Endoglina.....</b>	<b>35</b>
1. Estructura y mecanismo de acción	35
2. Función de la endoglina en la fisiología vascular	38
<b>Endoglina soluble.....</b>	<b>40</b>
1. Estructura y expresión	40
2. Regulación de la liberación de sEng en preeclampsia	41
2.1. Ambiente hipóxico	41
2.2. Oxisteroles	43
2.3. Factores Inflamatorios	44
2.4. Muerte de trofoblastos	44
3. Mecanismo de acción de sEng	46
4. Papel de sEng en preeclampsia	48
4.1. Biomarcador	48



4.2. Hipertensión	49
4.3. Proteinuria	50
4.4. Estado inflamatorio	51
4.5. Alteraciones en la placentación	52
Modelos animales de preeclampsia .....	54
<b>Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>57</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>61</b>
Materiales.....	63
Animales de experimentación.....	63
1. Mantenimiento y manipulación	63
2. Ratones transgénicos <i>sol.eng+</i>	64
2.1. Generación de ratones <i>sol.eng+</i>	64
2.2. Genotipado y fenotipado de ratones <i>sol.eng+</i>	66
3. Modelo animal de Preeclampsia	67
3.1. Modelo sEng+	67
Técnicas de experimentación animal .....	68
1. Medida de presión en cola	68
2. Extracción de sangre y recogida de plasma	70
2.1. Extracción de sangre del seno venoso submandibular	70
2.2. Extracción directa de sangre del corazón	71
3. Recogida de orina	71

4. Determinación del flujo uterino y fetal mediante láser Doppler	73
5. Extracción de fetos y placentas.	75
<b>Estudios histológicos .....</b>	<b>76</b>
1. Tinción Hematoxilina-Eosina	76
2. Tinción PAS (ácido periódico de Schiff)	77
3. Inmunohistoquímica	78
4. Cuantificación del área ocupada por células de glucógeno (GCs)	79
<b>Cultivos celulares.....</b>	<b>80</b>
1. Línea celular de trofoblastos	80
2. Técnicas Básicas en cultivos celulares	81
2.1. Tripsinización celular	81
2.2. Recuento celular	81
2.3. Congelación y descongelación celular	82
2.4. Tratamientos celulares	82
3. Ensayos de proliferación celular	83
3.1. Ensayo de proliferación con Metil tetrazollo (MTT)	83
3.2. ELISA de BrdU	83
4. Ensayos de migración e invasión celular	84
4.1. Ensayo de migración a través de transwell	84
4.2. Ensayo de invasión a través de Matrigel®	85
5. Determinación de la muerte celular	86

5.1. Determinación de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)	86
5.2. Determinación de la actividad de Caspasa 3	87
Explantos placentarios .....	88
Determinaciones Bioquímicas .....	89
1. Análisis de la tasa de filtración glomerular	89
1.1. Determinación de creatinina y aclaramiento de creatinina	89
1.2. Determinación de proteínas en orina	90
2. Determinación de la concentración de proteínas en tejido y células	91
3. Medida de estrés oxidativo	92
3.1. Determinación MDA	92
4. Determinación de la actividad de metaloproteinasas	93
5. Determinación de la concentración de glucógeno.	94
Técnica de ELISA.....	95
Análisis de la expresión génica .....	96
1. Extracción de ARN	96
2. Obtención de ADNc	97
3. Técnica de PCR cuantitativa (qPCR)	98
4. Diseño de cebadores para qPCR	100
Tratamiento de datos y análisis estadístico .....	102
<b>Resultados</b> .....	<b>109</b>
Modelo de preeclampsia "sol.eng+" .....	111

1. Caracterización del modelo	111
1.1. Concentración plasmática de hEng	111
1.2. Síntomas clínicos de preeclampsia en <i>sol.eng+</i>	112
1.3. Alteraciones renales en <i>sol.eng+</i>	113
2. Estudio de los efectos durante la gestación.	115
<b>Modelo animal de preeclampsia "sEng+" .....</b>	<b>117</b>
1. Caracterización del modelo	117
2. Síntomas clínicos de la preeclampsia	119
2.1. Hipertensión y proteinuria	120
2.2. Reducción del peso de las camadas	121
3. Alteraciones placentarias presentes en preeclampsia	125
3.1. Flujo útero-placentario	125
3.2. Alteraciones estructurales en la placenta	126
3.3. Hipoxia placentaria	132
3.4. Estrés oxidativo	136
3.5. Inflamación	137
3.6. Concentración plasmática de receptores solubles	138
3.7. Alteraciones renales	142
<b>Estudios <i>in vitro</i> .....</b>	<b>144</b>
1. Estudios de proliferación celular en trofoblastos	144
2. Estudios de migración e invasión celular en trofoblastos	145

3. Análisis de la muerte celular en trofoblastos	147
4. Estudio de la actividad de las enzimas metaloproteinasas en trofoblastos	149
5. Proceso de "pseudo-vasculogénesis" en trofoblastos	150
6. Liberación de sEng en células trofoblásticas	153
Endoglina soluble y BMP4.....	154
<b>Discusión.....</b>	<b>159</b>
Modelo animal de preeclampsia "sEng+" .....	163
1. Síntomas clínicos: hipertensión, proteinuria y reducción del crecimiento fetal	
164	
2. Alteraciones placentarias	166
2.1. Alteración del remodelado y flujo sanguíneo	166
2.2. Alteraciones en la acumulación de glucógeno placentario	170
3. Alteración en la concentración de receptores solubles en plasma.	173
4. Aumento de estrés oxidativo e inflamación	175
Estudios <i>in vitro</i> .....	178
sEng y BMP4.....	180
Papel de sEng en preeclampsia.....	183
<b>Conclusiones.....</b>	<b>185</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>189</b>
<b>Summary.....</b>	<b>223</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>243</b>

## Índice FIGURAS

FIGURA 1: Implantación del cigoto en el endometrio .....	9
FIGURA 2: Formación de las vellosidades placentarias .....	11
FIGURA 3: Estructura discoidal de la placenta .....	12
FIGURA 4: Arterias maternas .....	13
FIGURA 5: Circulación placentaria .....	14
FIGURA 6: Remodelación arterial .....	16
FIGURA 7: Estructuras placentaria .....	18
FIGURA 8: Remodelación de las arterias espirales normal vs preeclampsia .....	22
FIGURA 9: Complejo de receptores .....	37
FIGURA 10: Mecanismo de acción de sEng .....	46
FIGURA 11: Construcción génica para la generación de los ratones sol.eng+ .....	65
FIGURA 12: Obtención del modelo animal "sEng+" .....	67
FIGURA 13: Imagen de la pantalla de registro de presión medida en cola .....	68
FIGURA 14: Equipo NIPREM 1.5.....	70
FIGURA 15: Jaula metabólica .....	72
FIGURA 16: Adquisición de medidas de imágenes de flujo .....	74
FIGURA 17: Células JAr creciendo en cultivo .....	80
FIGURA 18: Esquema del experimento con <i>traswell</i> .....	86
FIGURA 19: Principio de la determinación de la concentración de glucógeno .....	95
FIGURA 20: Pasos para la extracción de ARN con el kit NucleoSpin®RNA II .....	97
FIGURA 21: Expresión de endoglina humana en plasma .....	111
FIGURA 22: Presión arterial y proteinuria de ratones Control y sol.eng+ .....	112
FIGURA 23: Peso de las camadas de ratones Control y sol.eng+ .....	113

FIGURA 24: Hematoxilina-eosina de riñones de ratones Control y sol.eng+ .....	114
FIGURA 25: Tasa de filtración glomerular en ratones Control y sol.eng+ .....	115
FIGURA 26: Presión arterial de ratones Control y sol.eng+ basal y gestantes .....	116
FIGURA 27: Expresión de sEng humana en fetos y placentas de gestantes sEng+ .....	118
FIGURA 28: Expresión de sEng humana en plasma de gestantes sEng+ .....	119
FIGURA 29: Presión arterial sistólica y proteinuria de gestantes WT y sEng+ .....	120
FIGURA 30: Peso de las camadas de gestantes WT y sEng+ .....	122
FIGURA 31: Peso de las placentas de gestantes WT y sEng+ .....	123
FIGURA 32: Porcentajes de abortos de gestantes WT y sEng+ .....	124
FIGURA 33: Flujo uterino y fetal de gestantes WT y sEng+ .....	126
FIGURA 34: H&E de placentas de gestantes WT y sEng+ a día 13 .....	128
FIGURA 35: H&E de placentas de gestantes WT y sEng+ a día 18 .....	129
FIGURA 36: Tinción de PAS de placentas de gestantes sEng+ .....	130
FIGURA 37: Área ocupada por CGs en placentas de gestantes WT y sEng+ .....	131
FIGURA 38: Concentración de glucógeno en placentas de gestantes WT y sEng+ .....	132
FIGURA 39: Expresión de HIF-1 $\alpha$ en placentas WT y sEng+ a día 13 .....	134
FIGURA 40: Expresión de HIF-1 $\alpha$ en placentas WT y sEng+ a día 18 .....	135
FIGURA 41: Concentración de MDA en placentas de gestantes WT y sEng+ .....	136
FIGURA 42: Expresión de citoquinas inflamatorias en placentas de gestantes WT y sEng+ .....	138
FIGURA 43: Concentración de mEng en plasma de gestantes WT y sEng+ .....	139
FIGURA 44: Concentración de mFlt1 y mPIGFen plasma de gestantes sEng+ y WT .....	141
FIGURA 45: H&E de riñones WT y sEng+ a día 18 de gestación .....	142
FIGURA 46: Tasa de filtración glomerular en gestantes WT y sEng+ a día 18 .....	143

FIGURA 47: Proliferación de células JAr en cultivo .....	145
FIGURA 48: Migración e invasión de células JAr en cultivo .....	147
FIGURA 49: Necrosis y apoptosis de células JAr en cultivo .....	148
FIGURA 50: Actividad de metaloproteinasas en células JAr en cultivo .....	150
FIGURA 51: Efectos de sEng sobre la expresión de moléculas de adhesión en células JAr.....	151
FIGURA 52: Efectos de sEng sobre la expresión de moléculas de adhesión en explantes placentarios .....	152
FIGURA 53: Efecto de sEng sobre la expresión de hEng .....	153
FIGURA 54: Concentración plasmática de BMP4 en gestantes WT y sEng+ .....	155
FIGURA 55: Expresión de BMP4 en placentas de gestantes WT y sEng+ .....	156
FIGURA 56 Efecto de sEng en la gestación: .....	172
FIGURA 57: Efecto de sEng en placentas de gestantes sEng+ .....	177
FIGURA 58: Hipotesis de la acción de sEng sobre la presión arterial a través de BMP4 .....	182



## Índice TABLAS

TABLA 1: Clasificación de la preeclampsia .....	4
TABLA 2: Etapas de la placentación .....	8
TABLA 3: Regiones de la placenta y características .....	17
TABLA 4: Anticuerpo empleado en inmunohistoquímica .....	79
TABLA 5: ELISAs empleados para determinar proteínas en plasma .....	96
TABLA 6: Cebadores de diseño propio para qPCR .....	100
TABLA 7: Cebador de comercial para qPCR .....	100
TABLA 8: Relación de reactivos y productos utilizados .....	104
TABLA 9: Relación de equipos/ aparatos utilizados .....	106



---

# ABREVIATURAS Y GOSARIO

---

*"Lo bueno sí breve, dos veces bueno."*

*Baltasar Gracian*



## Abreviaturas

AA-AT1	Anticuerpos agonistas de los receptores de angiotensina II, AT1
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario o copia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AVMA	Asociación de Medicina Veterinaria Americana ( <i>American Veterinary Medical Association</i> )
BMP	Proteínas morfogénicas del hueso ( <i>Bone Morphogenetic Proteins</i> )
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumina</i> )
Caspasas	Cisteinil-aspartato proteasas
CD31	Cluster de diferenciación 31 ( <i>Cluster of Differentiation 31</i> )
CMV	Virus del mosaico de la coliflor ( <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> )
Co	Concentración de creatinina en orina
Cp	Concentración de creatinina en plasma
CT	Citotrofoblasto
DTT	Ditiotritol
Ecad	Cadherina epitelial ( <i>Epithelial cadherin</i> )
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción enzimática ( <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
enCT	Citotrofoblastos endovasculares

Eng	Endogлина
<i>Eng</i> <sup>+/-</sup>	Genotipo de ratón transgénico haploinsuficiente en endogлина
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial ( <i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i> )
ET1	Endotelina 1
evCT	Citotrofoblastos extravellosos
FBS	Suero bovino fetal ( <i>Foetal Bovine Serum</i> )
FC	Frecuencia Cardiaca
Flt1	Receptor 1 de VEGF ( <i>fms related tyrosine kinase 1</i> )
FU	Flujo urinario
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa ( <i>GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase</i> )
GCs	Células de glucógeno
GSK	Glucógeno sintasa Kinasa
HA	Hemaglutinina de <i>Influenzza</i>
HELLP	<i>Hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count</i>
H&E	Hematoxilina-eosina
HHT	Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria ( <i>Haemorrhagic Hereditary Telangectasia</i> )
HIF-1 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ ( <i>Hypoxia-Inducible Factor 1<math>\alpha</math></i> )
HO-1	Hemo oxigenasa-1
HRE	Elemento de respuesta a hipoxia ( <i>Hypoxia Response Element</i> )
HRP	Peroxidasa de rábano picante ( <i>HorseRadish Peroxidase</i> )
Hsp90	Proteína de choque térmico 90 ( <i>Heat Shock protein 90</i> )
HUVECs	C. endoteliales de vena umbilical humana ( <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> )
INT	2-(4-iodofenil)-3-(4-dinitrofenil)-5-feniltetrazolio cloruro
IL-10	Interleucina 10

IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IUGR	Restricción del crecimiento uterino ( <i>Intrauterine Grow Restriction</i> )
Kb	Kilobase
L-Eng	Endoglina larga ( <i>Long Endoglin</i> )
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad ( <i>Low Density Lipoproteins</i> )
LXR	Receptor hepático X ( <i>Liver X Receptors</i> )
MAPK	Proteínas kinasas activadas por mitógeno ( <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> )
MMPs	Metaloproteinasas de matriz extracelular ( <i>Matrix metalloproteinases</i> )
MTT	Metil tetrazolio
MDA	Malonil dialdehido
NF $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas ( <i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cell</i> )
NK	Asesina Natural ( <i>Natural Killer</i> )
NO	Óxido nítrico ( <i>Nitric oxide</i> )
OMS	Organización Mundial de la Salud
OxLDL	LDL oxidadas
PAS	Ácido peryódico de Schiff ( <i>Periodic acid-Schiff</i> )
PAS	Presión Arterial Sistólica
PBS	Salino con tampón fosfato ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )

PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas ( <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> )
PECAM	Molécula endotelial de adhesión a plaquetas ( <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i> )
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
pNA	p-nitroanilide
qPCR	PCR cuantitativa
RFU	Reducción del flujo uterino
RGD	Tripéptido arginina – glicina – aspartato
rhEng	Endoglina humana recombinante ( <i>Recombinant Human Endoglin</i> )
ROS	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RUPP	Reducción de la presión de perfusión uterina ( <i>Reduction Uterine Perfusion Pressure</i> )
RXR	Receptor X retinoide ( <i>Retinoic X Receptor</i> )
SDS	Dodecil sulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
SEA	Servicio de Experimentación Animal
S-Eng	Endoglina corta ( <i>Short Endoglin</i> )
S-Eng+	Genotipo de ratón transgénico que sobre-expresa S-Eng humana
sEng	Endoglina soluble ( <i>Soluble Endoglin</i> )
sEng+	Ratón gestante empleado en este trabajo que sobre-expresa sEng humana
sTβRI	Receptor soluble de TGFβ tipo I ( <i>Soluble TGFβ Receptor I</i> )
sTβRII	Receptor soluble de TGFβ tipo II ( <i>Soluble TGFβ Receptor II</i> )
sFlt1	Forma soluble FLT1
<i>sol.Eng</i> <sup>+</sup>	Genotipo de ratón transgénico empleado en este trabajo que sobre-expresa sEng humana
SPF	Barrera libre de patógenos



---

ST	Sincitiotrofoblasto
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$ ( <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> )
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral ( <i>Tumour Necrosis Factor</i> )
T $\beta$ RI	Receptor de TGF $\beta$ tipo I ( <i>TGF<math>\beta</math> Receptor I</i> )
T $\beta$ RII	Receptor de TGF $\beta$ tipo II ( <i>TGF<math>\beta</math> Receptor II</i> )
VEcad	Cadherina vascular endotelial ( <i>Vascular endothelial Cadherin</i> )
VEGF	Factor endotelial de crecimiento vascular ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
WT	Genotipo wild type o salvaje, control utilizado en este trabajo
ZO-1	Proteína de las uniones ocluyentes 1 ( <i>Zonula Occludens 1</i> )

## Glosario de términos en inglés

<i>Curva de melting</i>	Curva de disociación de la doble hebra de ADN al someterla a un incremento gradual de la temperatura.
<i>Outlier</i>	Observación o dato que dista del resto de observaciones del experimento.
<i>Splicing alternativo</i>	Modificación postranscripcional de ajuste o eliminación alternativa de intrones para dar lugar a diferentes ARNm
<i>Housekeeping</i>	Genes cuya expresión se utiliza como control interno en los experimentos de qPCR por ser constitutiva o no regulada y, por tanto, constante en todas las condiciones del experimento.
<i>Tag</i>	Etiqueta, que en este caso se le pone al gen de una proteína en la generación de transgénicos, para facilitar la detección de la misma.
<i>Threshold</i>	Límite. En el contexto de la qPCR, línea horizontal que se establece sobre la gráfica de una reacción de qPCR y que corta a cada curva de amplificación, de cada una de las muestras, en su fase exponencial. Permite establecer el Ct (ciclo threshold), que es el ciclo de PCR al que la curva de amplificación de una determinada muestra corta la línea de threshold; el Ct será tanto menor cuanto mayor sea la cantidad del ADN sustrato de PCR en esa muestra.
<i>Transwell</i>	Inserto con el fondo de membrana porosa, para estudiar el paso o migración de las células <i>in vitro</i> .
<i>Wild type</i>	Genotipo salvaje.

---

# INTRODUCCIÓN

---

*"El milagro de existir, el instinto de buscar,  
la fortuna de encontrar, el gusto de conocer."*

*Y el amor, Joan Manuel Serrat*



## Preeclampsia

La preeclampsia es un trastorno hipertensivo específico del embarazo que se desarrolla a partir de la 20ª semana de gestación. Es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad, tanto materna como perinatal, en los países desarrollados.

Se estima que entre el 2 y el 8% de la embarazadas desarrollan preeclampsia (Duley, 2009; Eiland et al, 2012). A nivel mundial, cada año, diez millones de mujeres padecen esta enfermedad, de las cuales, 76.000 mueren debido a ella o a los trastornos cardiovasculares relacionados, mientras el número de fetos o neonatos que mueren alcanza los 500.000 por año (Kuklina et al, 2009).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la preeclampsia se diagnostica por presentar una presión arterial elevada ( $\leq 140/90$  mmHg) que puede ir acompañada por una elevada proteinuria ( $\leq 0,3$  g/24 h) a partir de la segunda mitad del embarazo. Pueden aparecer otra serie de síntomas, como edemas, disfunción endotelial, trastornos de coagulación sanguínea, etc. Por tanto, la preeclampsia se considera un trastorno complejo y multisistémico que puede afectar a diversos órganos (Pennington et al, 2012; Sones & Davisson, 2016).

### 1. Clasificación

Generalmente, la preeclampsia se puede clasificar según el momento de aparición temprana, intermedia y tardía (von Dadelszen et al, 2003), y según la

gravedad, dependiendo del grado de hipertensión, proteinuria o disfunción orgánica materna (TABLA 1). La progresión de leve a grave puede ser rápida, inesperada y, a veces fulminante. La forma más nociva de preeclampsia, asociada a una mayor tasa de mortalidad materna y perinatal, se conocen como eclampsia y síndrome de HELLP (Pennington et al, 2012; Sibai & Coppage, 2004).

**TABLA 1: Clasificación de la preeclampsia**

Según el momento de aparición	
Tipo	Características
Temprana	Aparición antes de la 34ª semana de gestación. Mayor riesgo
Intermedia	Aparición entre la semana 34ª y 37ª semana de gestación
Tardía	Aparición después de la 37ª semana de gestación. Mejor pronóstico
Según la gravedad	
Tipo	Características
Leve	- PA $\leq$ 140/90 mmHg, proteinuria $\leq$ 0,3 g/24 h
Grave	- PA $\leq$ 160/110 mmHg, proteinuria $\leq$ 5 g/24 h
Eclampsia/ Síndrome de HELLP	- PA $\leq$ 185/115 mmHg, proteinuria $\leq$ 10 g/24 h - Convulsiones y/o estado de coma - Hiperreflexia generalizada - Pérdida parcial o total de la visión - Dolor en el epigastrio

## 2. Factores de riesgo

Existen diversos factores de riesgo relacionados con la aparición y gravedad de la preeclampsia. La obesidad, la hipertensión crónica y la diabetes son algunos de ellos. También incluyen la nuliparidad, el embarazo adolescente, estados que causan hiperplacentación (como en el caso de un embarazo gemelar) así como alteraciones inmunológicas (lupus eritromatoso). Además, debido a la variabilidad en la incidencia entre los diversos grupos étnicos (mayor en mujeres afro-americanas y asiáticas que en mujeres caucásicas), se ha sugerido también la intervención de factores genéticos en el desarrollo de esta enfermedad, tanto de la madre como del feto (Cross, 2003; Eiland et al, 2012; Emanuel & Butt, 2015; Rao et al, 2006; Steegers et al, 2010).

## 3. Etiología

A pesar del estudio de los diversos factores de riesgo y del conocimiento del desarrollo de la enfermedad, buena parte de su etio-patogenia es aún una incógnita. Ni la causa exacta del origen de la preeclampsia, ni las claves que la precipitan han sido aún completamente identificadas.

Lo comúnmente aceptado es que la placenta juega un papel esencial en el desarrollo de la preeclampsia (De Maria & See, 1966; Roberts & Escudero, 2012). Esto queda patente por la rápida mejoría de los síntomas tras el alumbramiento y la permanencia de los mismos cuando aún no se ha retirado la placenta (Piering et al, 1993). Se ha demostrado, que el feto en sí, no es necesario para el desarrollo de esta enfermedad, ya que existen casos de preeclampsia en embarazos molares y extrauterinos, en los que no hay feto (Chun et al, 1964; Piering et al, 1993).

#### 4. Prevención y Tratamiento

La prevención primaria de la preeclampsia, en aquellas mujeres consideradas “de riesgo”, es un tema polémico y objeto de investigación activa. En ellas se incluyen el uso de suplementos de calcio, administración de magnesio o zinc, aspirina a bajas dosis, suplementos de vitaminas C y E y antioxidantes (Bujold et al, 2010; Hofmeyr et al, 2010; Poston et al, 2006). Sin embargo, ninguno de ellos ha resultado suficientemente efectivo en la prevención del desarrollo de la preeclampsia o no hay suficientes evidencias para su recomendación. Hasta la fecha, el único tratamiento definitivo para la preeclampsia es la interrupción voluntaria del embarazo, el parto del feto y la expulsión de la placenta. Sin embargo, el parto prematuro puede llevar al desarrollo de otra serie de complicaciones secundarias. Por lo tanto, es muy importante buscar nuevas alternativas terapéuticas para mejorar la supervivencia y calidad de vida, tanto de la madre como del recién nacido. En los últimos años, se han desarrollado diversas líneas de investigación para intentar elucidar la patogenia de esta enfermedad, lo que permitiría desarrollar nuevos tratamientos más efectivos, así como un mejor y precoz diagnóstico.

Recientemente, se ha propuesto el empleo de receptores solubles presentes en el plasma de mujeres con preeclampsia, como potentes biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de la preeclampsia. La forma soluble del receptor de membrana para VEGF, FLT1 (sFLT1) y la forma soluble del receptor de membrana endoglina (sEng o endoglina soluble), están presentes en altas cantidades en el plasma de estas pacientes varias semanas antes de la aparición de los síntomas clínicos. La presencia de estos factores se ha asociado con la aparición de preeclampsia, y sus niveles se han correlacionado con una mayor gravedad y peor pronóstico de la enfermedad (Dechend & Luft, 2008; Farina et al, 2008; Grill et al,



2009; Hod et al, 2015; Levine et al, 2006; Lopez-Novoa, 2007; Troisi et al, 2008). A pesar de ello, tanto el origen como el mecanismo de liberación y de acción de estos factores solubles en la preeclampsia, no están aún bien descritos.

En el presente trabajo, hemos querido esclarecer el papel que juega endoglin soluble (sEng) en la patogenia de la preeclampsia. Nuestro objetivo es desenmarañar parte de la etiología de esta compleja enfermedad con el fin de poder acercarnos un poco más al desarrollo de un mejor diagnóstico y tratamiento de la misma, que nos permita reducir, tanto su tasa de mortalidad como su tasa de incidencia.

## Placenta

La placenta es un órgano específico del embarazo que establece una conexión vital entre la madre y el feto. Está formada por una parte fetal, que se desarrolla a partir del corion frondoso, y una porción materna, que deriva del endometrio y es conocida como decidua basal.

La placenta forma una verdadera interfaz entre la circulación materna y la fetal que facilita el intercambio gaseoso y metabólico entre ambos sistemas circulatorios. Además, posee función endocrina, ya que libera gran cantidad de hormonas, y actúa como barrera entre ambos sistemas inmunes para evitar rechazos. Alteraciones en el funcionamiento de la placenta pondría en peligro el cumplimiento de estas funciones, que son básicas para el correcto desarrollo del embarazo, comprometiendo la salud, tanto de la madre como del feto.

## 1. Desarrollo y estructura de la placenta

La placenta comienza a formarse en el mismo momento en que el óvulo fecundado se implanta en la pared del útero, aproximadamente el 6º día tras la fecundación.

El desarrollo de la placenta lo podemos dividir en varias etapas, reflejadas en la siguiente tabla (TABLA 2):

**TABLA 2: Etapas de la placentación**

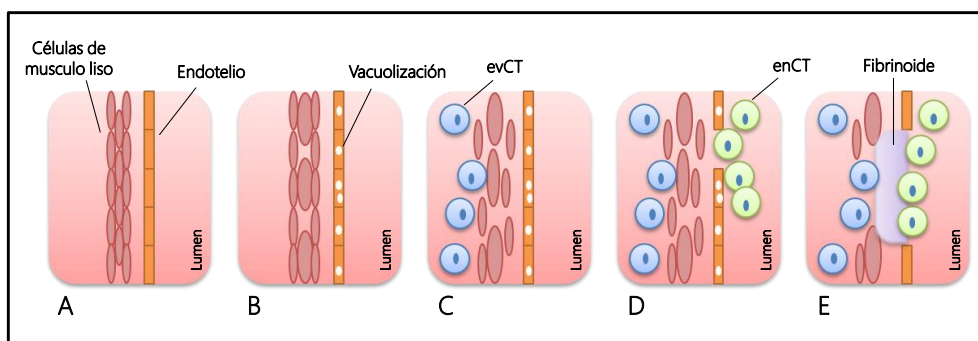
Prevellositaria	
Prelacunar	Del 6º al 9º día de gestación
Lacunar	Del 9º al 13º día de gestación
Vellostitaria	
Velositades inmaduras	De la 6ª a la 16ª semana de gestación
Velositades en vías de maduración	De la 16ª a la 36ª semana de gestación
Velositades maduras	De la 16ª a la 40ª semana de gestación

En la etapa prelacunar, tiene lugar la implantación del cigoto en el útero materno. En este momento, el cigoto está constituido por una capa celular externa denominada trofoblasto y un cúmulo celular interno llamado embrioblasto. Esta estructura se conoce como blastocisto. El trofoblasto provee de nutrientes al embrión y se desarrolla como parte importante de la placenta. Por medio del trofoblasto se logra la implantación del embrión en el endometrio uterino, aunque estas células no llegan a ser incorporadas ni al cuerpo materno ni al fetal.

Una vez implantado el blastocisto en el endometrio, el trofoblasto se diferencia en sincitiotrofoblasto (ST) y citotrofoblasto (CT). El ST se caracteriza por ser una

masa citoplasmática sin límites intercelulares, polinucleada y con capacidad de emitir brotes con actividad citolítica. El CT por su parte, rodea la cavidad del blastocisto y constituye una capa incompleta y fina de células poliédricas con citoplasma claro y abundantes mitosis (Guyton et al, 2006) (FIGURA1.A).

Como nota aclaratoria, decir que en esta parte, cuando hablamos de trofoblasto, nos estamos refiriendo a la zona externa del blastocisto. Más adelante, también hablaremos de trofoblastos para referirnos al tipo celular por el que están formadas mayoritariamente las placentas.



**FIGURA 1:** Implantación del cigoto en el endometrio

**A.** La implantación comienza a partir del 6º día. El blastocisto está rodeado por una capa de CT y más externamente ST que penetran por el endometrio. **B.** A partir del día 9º, aparecen las lagunas sincitiales. El blastocisto, gracias a los ST, sigue penetrando por el endometrio. **C.** A partir del 11º-12º día, los capilares maternos pierden su revestimiento y pasan a denominarse espacios intervellosos o sinusoides que vierten su contenido a las lagunas sincitiales. A partir del 13º día, la proliferación de los CT a través de la capa de ST comienza a formar las vellosidades. Adaptado de *Peterson Education INC* publicado por Benjamin Cummings.

Al 9º día de gestación, comienza el periodo lacunar. En la capa de ST comienzan a aparecer pequeñas lagunas que, inicialmente, son vacuolas aisladas que se van

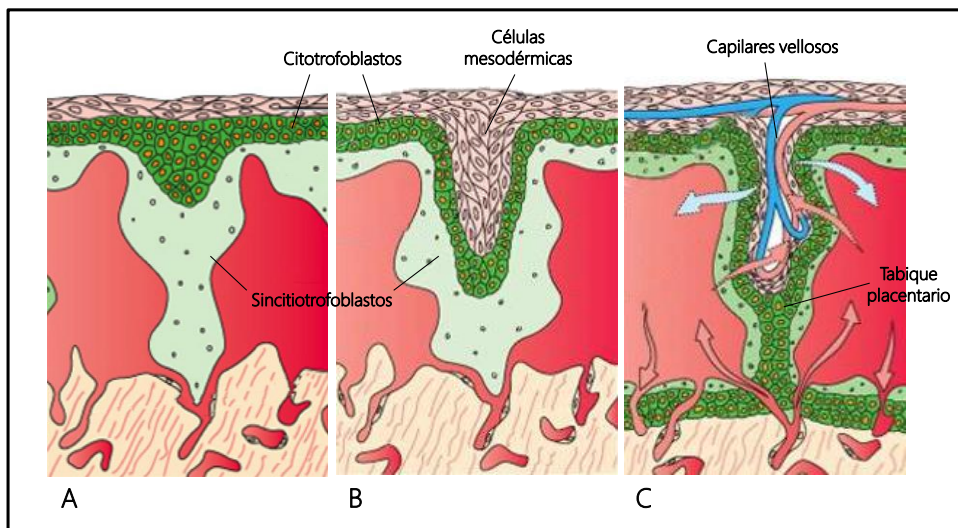
fusionando hasta formar lagunas de gran tamaño, denominadas, lagunas sincitiales (FIGURA 1.B).

En los días 11º-12º, el ST, gracias a su capacidad citolítica, se va introduciendo en el estroma del endometrio y erosiona el revestimiento endotelial de los capilares maternos. Estos capilares, denominados espacios intervillosos o sinusoides, se encuentran dilatados y se unen a las lagunas sincitiales, por lo que la sangre pasa de éstos capilares a las lagunas, lo que da lugar al establecimiento de la circulación útero-placentaria. Alrededor del día 13º de gestación, los CT proliferan rápidamente y se introducen en la capa de ST, forman unas columnas de células de CT rodeadas de ST que se denominan vellosidades primarias (FIGURA 1.C y FIGURA 2.A).

Al inicio de la 3ª semana, comienza el crecimiento de las células mesodérmicas hacia el núcleo de las vellosidades primarias, lo que da lugar a las vellosidades secundarias (FIGURA 2.B). Cerca del final de la 3ª semana, las células mesodérmicas se diferencian a células sanguíneas y vasos de bajo calibre, que forman lo que denominamos capilares vellosos. En este punto, se consolida la estructura vellositaria definitiva, denominada vellosidad terciaria, coriónica o vellosidades placentarias definitivas. Las vellosidades terciarias se unen y constituyen cotiledones separados por tabiques placentarios. Estos tabiques se forman cuando las vellosidades invaden la decidua y erosionan el tejido, de manera que aumentan su superficie de contacto (FIGURA 2.C).

A medida que se forman las vellosidades terciarias, los CT siguen proliferando y atraviesan la capa de ST hasta la pared del endometrio, donde se forman una delgada envoltura citotrofoblástica externa formada por CT, denominados citotrofblastos extravellosos (evCT). Los evCT se caracterizan por ser células proliferativas de naturaleza invasora que migran por el epitelio uterino hasta la

superficie del miometrio, donde se ponen en contacto con las arterias espirales. Las arterias espirales son ramificaciones de la arteria uterina que penetran por unas hendiduras existentes en la envoltura citotrofoblástica y llevan la sangre materna a los espacios intervelllosos o sinusoides. Para llevar a cabo su función, estas arterias van a sufrir una serie de cambios estructurales y fisiológicos inducidos por los evCT que comentaremos más adelante (Pijnenborg et al, 2006).

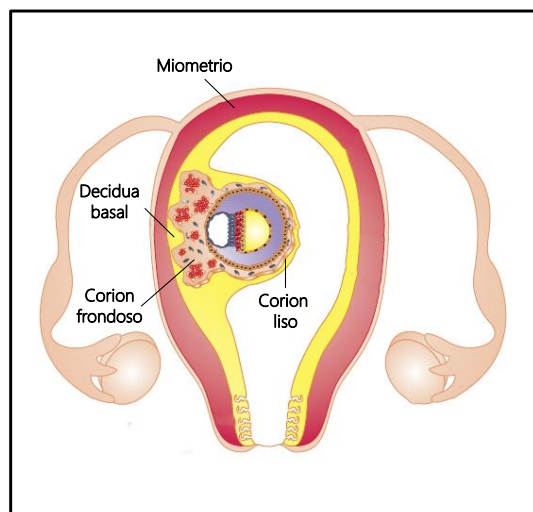


**FIGURA 2:** Formación de las vellosidades placentarias

**A.** Vellosidades primarias: Los CT penetran por la capa de ST. **B.** Vellosidades secundarias: Las células mesodérmicas penetran por la vellosidad primaria. **C.** Vellosidades terciarias: las células mesodérmicas se diferencian en capilares vellosos. Se forman los tabiques placentarios que divide la placenta en cotiledones. Adaptado de Benirschke y cols (Benirschke & Driscoll, 1967).

A los 56 días de gestación, las vellosidades han proliferado de forma abundante alrededor del saco embrionario. Aquellas vellosidades que se localizan en el polo embrionario experimentan un desarrollo más acelerado y dan origen al corion frondoso, mientras que las que se desarrollan en el polo abembrionario degeneran y forman el corion liso (FIGURA 3). El corion frondoso junto con la decidua basal

dará origen a la placenta, mientras que el corion liso únicamente tiene función de protección (Guyton et al, 2006).



**FIGURA 3:**

### Estructura discoidal de la placenta

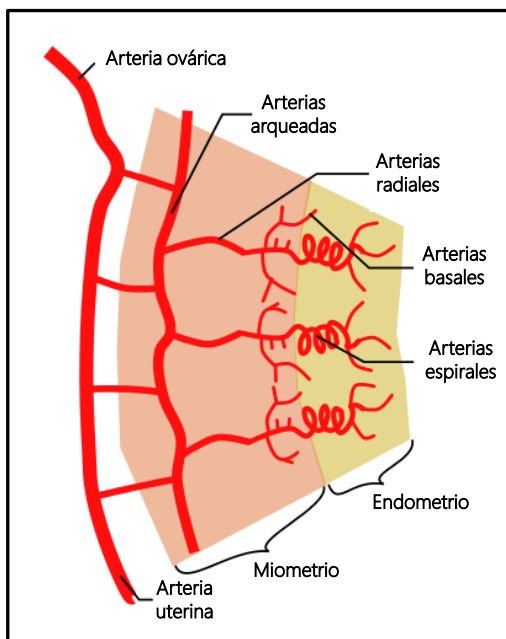
En el polo embrionario se desarrolla el corion frondoso, que junto con la decidua basal de la madre, da lugar a la placenta. El polo abembrionario da lugar al corion liso que carece de vellosidades. Adaptado de Biología del Desarrollo, Norberto López Serna, publicado por Mc Graw Hill.

Morfológicamente, la placenta humana se clasifica como discoidal, ya que las vellosidades del corion abarcan un área circular y polarizada, mientras que, histológicamente, se clasifica como placenta hemocorial, es decir, las vellosidades coriónicas están en contacto con la sangre de la madre. No existen barreras maternas, y de las barreras fetales, después de la 20ª semana de gestación, sólo queda el endotelio y una reducida capa de trofoblasto. Este tipo de placentas también está presente en roedores, con la diferencia de que en estos animales es laberíntica, es decir, con las vellosidades unidas entre sí, mientras que en los humanos es vellosa, con las vellosidades independientes separadas por tabiques (Roa et al, 2012).

## 2. Circulación placentaria

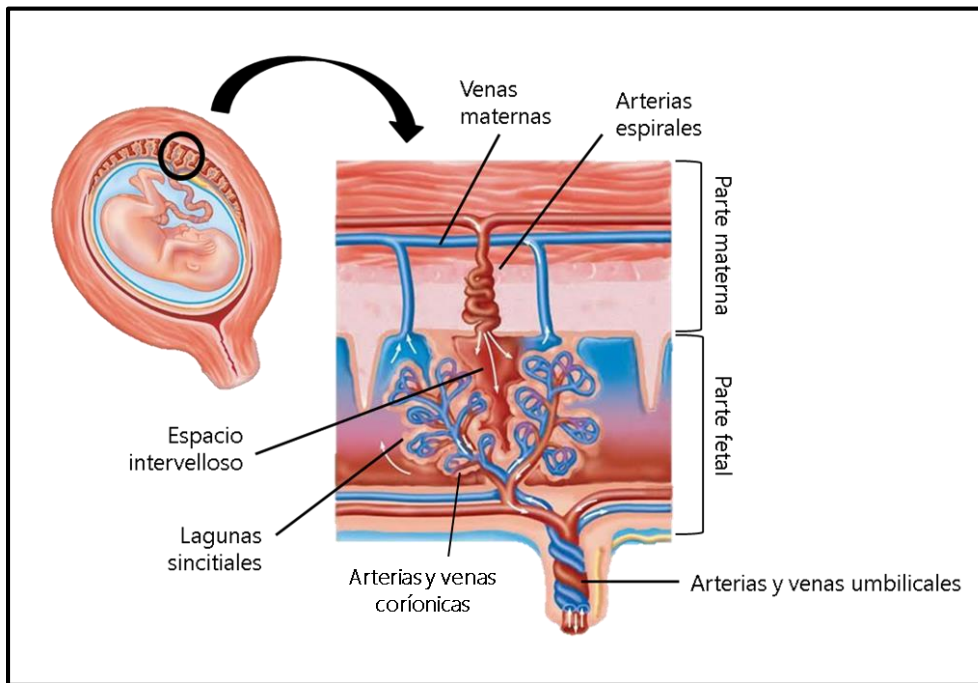
Como ya citamos, la placenta actúa como un intercambiador de sustancias y gases entre la sangre materna y fetal. Por tanto, el establecimiento de una adecuada circulación útero-fetal es esencial para la correcta funcionalidad placentaria.

El útero es irrigado por dos arterias uterinas, derecha e izquierda que lo recorren lateralmente. Se ramifican en las arterias arqueadas que penetran por el miometrio, como podemos observar en la figura 4. Las arterias arqueadas dan origen a las arterias radiales, que discurren por el miometrio dirigiéndose hacia el endometrio. En la zona cercana a la unión miometrio-endometrio, se dividen en arterias basales que irrigan el miometrio y la parte basal del endometrio, y continúan hacia la zona endometrial donde se vuelven a ramificar y dan lugar a las arterias espirales (FIGURA 4).



**FIGURA 4:** Arterias maternas

Esquema de la red de arterias que establecen la circulación placentaria materna. Adaptado de Robertson (Robertson, 1976).



**FIGURA 5:** Circulación placentaria

En la circulación materna las arterias espirales penetran por las hendiduras de la envoltura citotrofoblástica y vierten la sangre al interior del espacio intervelloso. La sangre materna pasará a las lagunas sincitiales, las cuales son drenadas por las venas maternas. En la circulación fetal, las arterias y venas umbilicales que se dividen en arterias y venas coriónicas, penetran en el interior de las vellosidades coriónicas donde tiene lugar el intercambio de sustancias y gases. Adaptado de *Peterson Education INC* publicado por Benjamin Cummings.

Las arterias espirales penetran por las hendiduras de la envoltura citotrofoblástica y vierten la sangre al interior del espacio intervelloso, de donde pasa a las lagunas del sincitio (Pijnenborg et al, 2006). Éstas, son drenadas por las venas endometriales o maternas, que también penetran por la envoltura citotrofoblástica y llevan la sangre de vuelta a la circulación materna una vez que ha tenido lugar el intercambio. En la circulación fetal, la sangre desoxigenada pasa por las arterias umbilicales que se dividen en arterias coriónicas y penetran en el interior de las



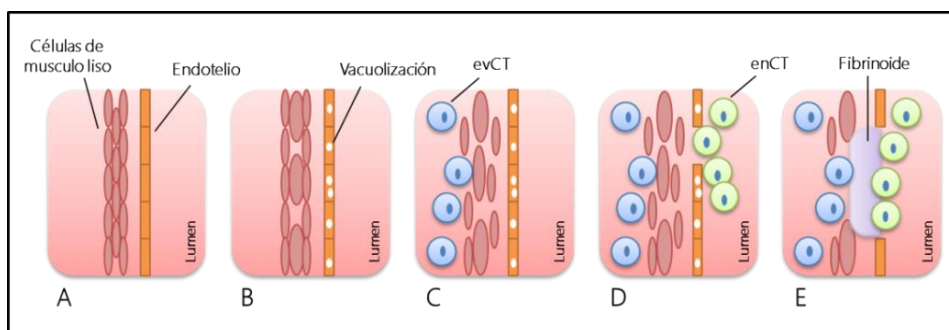
vellosidades coriónicas. Estas vellosidades proporcionan una superficie muy amplia en la que tiene lugar el intercambio. La sangre oxigenada es conducida por las venas coriónicas que se disponen de la misma manera que las arterias y retornan de nuevo al feto por medio de la vena umbilical (FIGURA 5) (Guyton et al, 2006).

## 2.1. Remodelado de las arterias espirales

Como hemos visto, las arterias espirales son las encargadas del suministro de sangre materna hacia el interior de la placenta, donde tendrá lugar el intercambio. Durante el proceso de desarrollo placentario, las arterias espirales sufren un remodelado que permite un mayor aporte sanguíneo hacia la placenta y el establecimiento de una adecuada circulación materno-fetal. Este remodelado se lleva a cabo en varios pasos entre la 8-18ª semana de gestación, detallados a continuación:

Los evCT, que forman parte de la envoltura citotrofoblástica, penetran hacia la decidua materna e invaden los tejidos estromales. Esto se conoce como invasión intersticial, donde los evCT van rodeando las arterias espirales (Chalazonitis & Kessler, 2012). Se produce entonces la vacuolización de las células endoteliales que rodean al vaso. Las células del músculo liso de la pared comienzan a hincharse (FIGURA 6.B) y los evCT inician su invasión hacia el interior del vaso, lo que se conoce como invasión endovascular, que va asociada a una desorganización de la capa de músculo liso (FIGURA 6.C). Para que la invasión trofoblástica tenga lugar, los evCT experimentan un proceso de diferenciación, cambiando su fenotipo epitelial por uno endotelial, por lo que pasan a denominarse citotrofoblastos endovasculares (enCT) (FIGURA 6.D). Los enCT se integran en la pared del vaso, de tal manera que el endotelio es temporalmente reemplazado por estas células. La capa de células del músculo liso y las láminas elásticas son sustituidas por una capa

de fibrinoide (FIGURA 6.E). De esta manera, las arterias espirales pasan de ser vasos de alta resistencia con paredes tortuosas y engrosadas a vasos de baja resistencia con paredes mucho más elástica y moldeables, lo que incrementa la capacitancia del vaso (Brosens et al, 1967; Burton et al, 2009; Pijnenborg et al, 2006).



**FIGURA 6:** Remodelado arterial

**A.** Estructura de la pared de las arterias espirales antes del remodelado, donde se observa una capa de células endoteliales rodeadas de células de músculo liso. **B.** En el primer paso del remodelado, tiene lugar la vacuolización de las células endoteliales, y las células del músculo liso comienzan a hincharse. **C.** A continuación la capa de músculo liso se desorganiza y los evCT empiezan a penetrar por el interior. **D.** Los evCT cambian su fenotipo a enCT integrándose en la pared del vaso. **E.** Al final se produce la sustitución de la capa de músculo liso por una capa de fibrinoide. Adaptado de Pijnenborg y cols (Pijnenborg et al, 2006).

## Placenta de ratones vs humanos

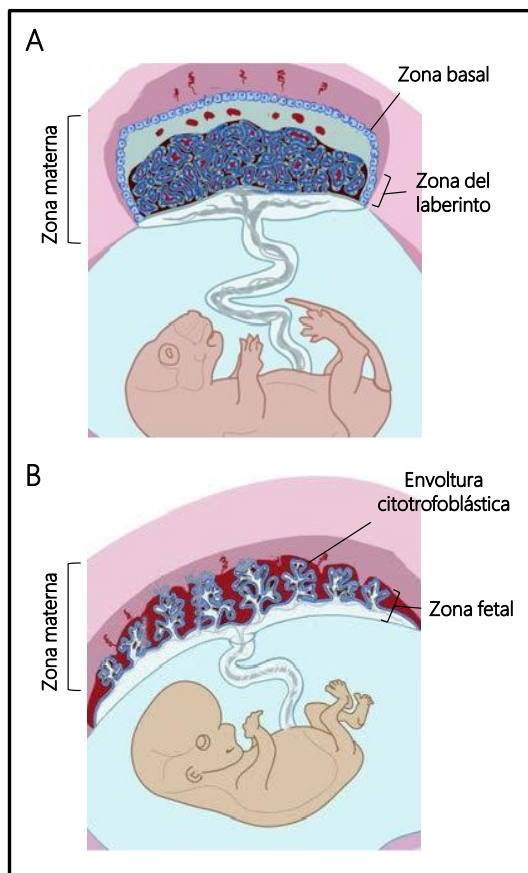
Los roedores son uno de los mamíferos más empleados en investigación y por tanto, el conocimiento de los mecanismos fisiológicos de esta especie está en constante desarrollo. Debido a las obvias limitaciones que presenta el estudio de la placentación en humanos, se han empleado modelos animales, sobre todo ratones, para este fin. El empleo de estos roedores está favorecido, en parte, por las amplias

posibilidades que ofrece la manipulación genética, relativamente fácil en esta especie. Sin embargo, para la aplicación médica de estos estudios, es importante la correcta extrapolación de los resultados, teniendo en cuenta los mecanismos de placentación de ambas especies, sus tipos celulares y su función. Por ello, a continuación, compararemos las placentas de ambos tipos de especies: ratones y humanos.

Tanto la placenta humana como la murina, están formadas por células de origen embrionario y materno, que podemos dividir en tres regiones anatómica y fisiológicamente diferenciadas (TABLA 3 y FIGURA 7).

**TABLA 3: Regiones de la placenta y características**

Placenta humana	Placenta murina	Características
Zona fetal	Zona del laberinto	Zona de intercambio de sustancias. Conductos sanguíneos maternos y fetales
Envoltura citotrofoblástica	Zona basal	Zona compuesta por citotrofoblastos por donde penetran los vasos maternos
Zona materna	Zona materna	Zona que comprende la decidua basal y el miometrio. Contiene vasos sanguíneos maternos (arterias y venas)

**FIGURA 7:**

### Estructura placentaria. Ratón vs Humano

A. Estructura de la placenta de ratón. B. Estructura de la placenta humana. Adaptado de Robinson y cols (Robbins et al, 2010).

#### 1. Zona fetal vs zona del laberinto

La zona fetal en placentas humanas y la zona del laberinto en ratones, son funcionalmente análogas, ya que en ambas tiene lugar el intercambio de sustancias. Además, también presentan una similitud a nivel estructural y funcional que hace que se agrupen en la misma categoría, placenta discoidal y hemocorial. Sin embargo, se diferencian en la cantidad de ramificaciones coriónicas que presentan, ya que estas son más numerosas en las placentas murinas, pero con la diferencia de que están todas interconectadas, sin formar vellosidades, por ello se conoce como zona del laberinto. Como resultado, el área de intercambio en las placentas

humanas es más amplia, ya que las vellosidades coriónicas aumentan la superficie de intercambio (Roa et al, 2012; Watson & Cross, 2005).

En humanos el intercambio efectivo de sustancias que tiene lugar en esta zona, no se establece hasta aproximadamente la 12ª semana de gestación, por lo que hay una falta de circulación eficiente en el primer trimestre (Jauniaux et al, 1995; Jauniaux et al, 2000). En ratones ocurre algo similar, la zona del laberinto se aprecia hacia el día 10,5 de gestación, mientras que la circulación materno-fetal efectiva no se establece hasta el día 12,5, que corresponde con la segunda mitad de preñez, ya que el tiempo de gestación aproximado en ratones es 19,5 días (Muntener & Hsu, 1977). Por tanto, no es hasta las últimas etapas cuando tiene lugar el eficiente intercambio de nutrientes y, en consecuencia, el mayor desarrollo fetal, tanto en humanos como en ratones.

## 2. Envoltura citotrofoblástica vs zona basal

La función de esta zona no se conoce con exactitud, aunque su correcto desarrollo es esencial para la viabilidad fetal (Hustin et al, 1990; Tanaka et al, 1997). La secreción de gran cantidad de hormonas por parte de las células citotrofoblásticas que forman la envoltura, y su interacción directa con la sangre materna, hace pensar que puede tener una importante función metabólica (Georgiades et al, 2002).

En la zona basal de la placenta de los ratones existen dos tipos de células trofoblásticas: espongioblastos y células de glucógeno (GCs). Aunque el origen de las GCs no está muy claro, se cree que derivan de las células trofoblásticas gigantes (Simmons & Cross, 2005). Histológicamente, las células de glucógeno presentan un

aspecto vacuolado con un citoplasma claro que corresponden con grandes acúmulos de glucógeno. Estas células aparecen formando agrupaciones a partir del día 12,5 de gestación y van incrementando su número hasta el día 15,5. A partir de ese momento y hasta el final de la gestación, van desapareciendo de la zona basal, lo cual se cree que es debido a una invasión gradual hacia la decidua basal, un aumento de muerte celular o una mezcla de ambos procesos (Adamson et al, 2002; Coan et al, 2006; Coan et al, 2004; Waddell et al, 2000). La función de estas células tampoco está bien definida. Se cree que las GCs son análogas a los evCT en humanos que invaden la decidua, penetran en las arterias espirales y contribuyen así al remodelado arterial. Debido a los grandes acúmulos de glucógeno citoplasmáticos que poseen estas células, se piensa que además, las GCs pueden actuar como fuente de energía. Mediante la movilización de las reservas de azúcares y su liberación a la circulación materna, contribuirán al crecimiento fetal en la última etapa de gestación (Coan et al, 2006; Lefebvre, 2012).

### **3. Zona materna de humanos vs zona materna de ratón**

En la decidua basal de las placentas de ambas especies encontramos arterias espirales y venas maternas. En humanos, los evCT invaden las arterias espirales, como ya hemos explicado anteriormente, lo que contribuye al remodelado arterial, esencial para el correcto aporte sanguíneo a la placenta. En ratones, hacia el final de gestación (15,5-18,5), las células de glucogeno van penetrando por la decidua y rodean las arterias espirales (Coan et al, 2006; Coan et al, 2004; Waddell et al, 2000). La invasión de las GCs se produce únicamente a nivel intersticial y no endovascular, es decir, sin penetrar en el lumen de las arterias, a diferencia de lo que ocurre en humanos (Adamson et al, 2002; Carter, 2007). Por tanto, las células endoteliales de

la parte central de las arterias espirales de la decidua de ratones, no son reemplazadas por células trofoblásticas. Sin embargo, la invasión de las GCs si está acompañada de una pérdida gradual de la capa de células musculares del vaso, que es reemplazada por una capa acelular de material eosinófilo (Georgiades et al, 2002; Pijnenborg et al, 1981). Por tanto, este fenómeno observado en arterias de ratones, parece ser análogo, en sus consecuencias funcionales, al proceso de remodelado de las arterias espirales que ocurre en humanos.

Como conclusión podemos decir que, a pesar de las distintas nomenclaturas, tanto de los tipos celulares como de las regiones de la placenta entre humanos y ratones, su funcionalidad y estructura es bastante similar en ambas especies, a pesar de las diferencias señaladas (Adamson et al, 2002; Carter, 2007). Por lo que el empleo de ratones sería un buen modelo animal para el estudio de los procesos implicados en la placentación.

## Alteraciones en preeclampsia

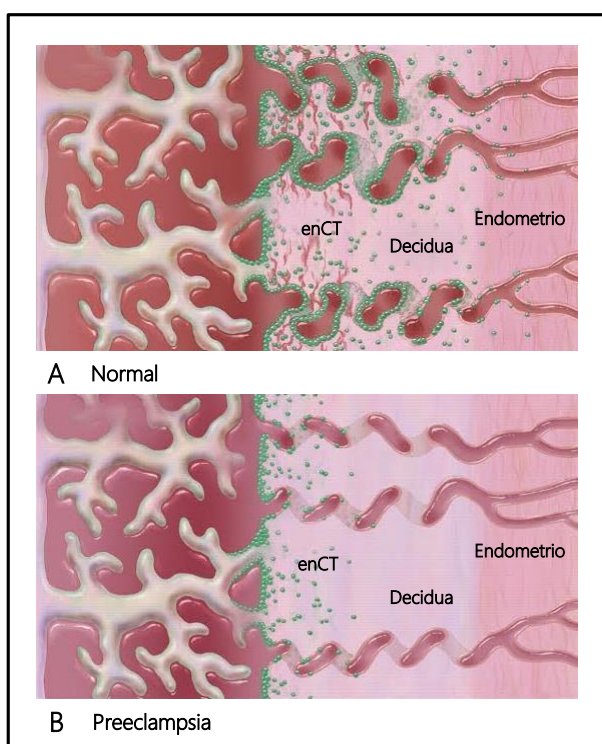
### 1. Defectos en placentación

#### 1.1. Alteración en el remodelado de las arterias espirales

Como ya hemos explicado, la placenta ocupa un papel central en preeclampsia. Una de las teorías más aceptadas para explicar el origen de esta enfermedad, es la relacionada con las alteraciones en el desarrollo placentario (De Maria & See, 1966;

Roberts & Escudero, 2012) y en concreto, con la alteración en el remodelado de las arterias espirales (Brosens, 1964; Browne & Veall, 1953).

Generalmente, la causa de los defectos en el remodelado arterial se asocia a una alteración en la invasión de los trofoblastos endovasculares (enCT) (Kaufmann et al, 2003; Pijnenborg et al, 2006). Esto hace que no se produzca el reemplazo de las células del endotelio y, como consecuencia, los vasos se mantienen como vasos de baja capacitancia (FIGURA 8) (Cnossen et al, 2008; Meler et al, 2010a).



**FIGURA 8:** Remodelado de las arterias espirales normal vs preeclampsia

A. Remodelado de las arterias espirales en un embarazo normal. B. Remodelado de las arterias espirales en preeclampsia. Adaptado de Pennington y cols (Pennington et al, 2012).



La alteración de la invasión se ha asociado a un defecto en la diferenciación del evCT a enCT, que requiere un cambio de las moléculas de adhesión intercelulares características de las células epiteliales (integrina  $\alpha 6 \beta 4$ , Ecadherina), por las moléculas características de las células endoteliales (CD31, VEcadherina, VCAM-1 e integrina  $\alpha 5 \beta 1$  y  $\alpha 1 \beta 1$ ). A este proceso se le conoce como “pseudo-vasculogénesis”. Se ha observado que trofoblastos obtenidos de mujeres con preeclampsia o bien no muestran este fenómeno o es defectuoso (Fisher, 2004; Zhou et al, 1997a).

A parte de la pseudo-vasculogénesis, existen otros procesos implicados en el remodelado de las arterias espirales. Uno de ellos es la liberación, por parte de los trofoblastos, de gran cantidad de citocinas y factores de crecimiento, como el factor de necrosis tumoral (TNF), que inducen apoptosis tanto de células endoteliales como de células de músculo liso vascular, un proceso importante en el remodelado vascular. Otro procesos implicados en el remodelado son los cambios en la composición de la matriz extracelular, cambios en la actividad de las enzimas metaloproteinasas, y alteraciones del sistema inmune, como alteraciones funcionales de las células NK (Whitley & Cartwright, 2010). Por tanto, modificaciones de cualquiera de estos procesos podrían resultar en un remodelado arterial defectuoso.

A pesar de estos avances en el conocimiento de los mecanismos implicados en la invasión y remodelado, la regulación de estos procesos no está clara, por lo que se requiere de un estudio más minucioso y exhaustivo. El proceso de obtención de muestras en etapas tempranas de gestación es muy complejo, y además no se cuenta con técnicas estandarizadas en la recolección de biopsias. Por ello, se ha optado por emplear modelos *in vitro* y/o modelos animales, con la problemática de extrapolación de resultados que ello supone. A esto hay que sumarle el hecho de que el proceso de invasión y remodelado es un mecanismo complejo sobre el que

influyen múltiples factores genéticos, inmunes, maternos, fetales, endocrinos y cardiovasculares (Burke & Karumanchi, 2013), lo que dificulta aún más su estudio. Por tanto, los mecanismos que regulan el remodelado arterial, así como las causas que inducen su alteración en preeclampsia, no están completamente elucidadas.

## 1.2. Hipoperfusión placentaria

Se ha observado, que el calibre de las arterias uterinas de las mujeres con preeclampsia es similar al de mujeres no embarazadas, y es mucho menor que el calibre de los vasos en un embarazo normal (Brosens et al, 1972). Esto trae como consecuencia una restricción en el aporte de nutrientes y oxígeno al feto, lo que resulta en una hipoperfusión placentaria. Por ello, una de las principales pruebas diagnósticas de la preeclampsia, junto con otra serie de análisis adicionales, es la medición, mediante la técnica de *Eco Doppler*, del flujo de las arterias uterinas y umbilicales, que se encuentra reducido en esta enfermedad (Ghi et al, 2009; Meler et al, 2010b).

La reducción del flujo uterino puede deberse, al menos en parte, a las alteraciones en el remodelado arterial, pero también a la arterioesclerosis observada en estas arterias. Se ha descrito que en mujeres con preeclampsia existe una arterioesclerosis aguda en las arterias espirales (Meekins et al, 1994). La arterioesclerosis se caracteriza por depósitos lipídicos en el subendotelio, necrosis vascular e infiltración de leucocitos y macrófagos en la zona perivascular (Labarrere, 1988). Estos depósitos podrían estar contribuyendo a la reducción de flujo hacia la placenta (Sebire & Sepulveda, 2008). Sin embargo, no está del todo claro si estos acúmulos son también, a su vez, consecuencia de una alteración en el remodelado arterial, ya que se ha asociado la presencia de estas lesiones con aquellos vasos con características similares a los de preeclampsia (Robertson et al, 1967).

Otros cambios patológicos evidentes en la placenta de mujeres con preeclampsia son: depósitos de fibrina entre las células de la capa de ST, daños en la vasculatura intrínseca de la placenta, reducción de la superficie de contacto de las vellosidades coriónicas y liberación de restos celulares a la circulación sistémica procedentes del aumento de necrosis de los trofoblastos (Fisher, 2015). Estas alteraciones podrían ser consecuencias secundarias de la hipoperfusión. La reducción del aporte sanguíneo hacia la placenta podría ser responsable de la generación del daño placentario, que culminaría con el desarrollo de la sintomatología.

## 2. Hipoxia placentaria

Durante la preeclampsia tiene lugar una disminución de la concentración de oxígeno en la placenta. Este ambiente hipóxico generado podría tener un papel central en el desarrollo de esta enfermedad (Lunell et al, 1982; Roberts & Post, 2008; Soleymanlou et al, 2005; Zamudio et al, 2007).

Diversos hechos apoyan la relación directa entre la hipoxia placentaria y el desarrollo de preeclampsia:

- Enfermedades asociadas a una insuficiencia vascular (hipertensión, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad renal, trombofilias) aumentan el riesgo de placentación anormal y preeclampsia (Emanuel & Butt, 2015).
- Condiciones obstétricas que incrementan la masa placentaria sin el correspondiente aumento del flujo sanguíneo en la placenta (mola hidatiforme, diabetes mellitus, embarazo gemelar) resultan en isquemia relativa y están asociadas a la aparición de preeclampsia (Bdolah et al, 2008).

- Mayor incidencia de esta enfermedad en mujeres que viven en altitudes elevadas (> 3100 m) (Palmer et al, 1999).

En un ambiente hipóxico se inhibe la degradación del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , por lo que incrementa su concentración. HIF-1 $\alpha$  regula la expresión de gran variedad de genes relacionados con la respuesta celular a hipoxia. La hipótesis de la hipoxia placentaria como parte esencial en el desarrollo de esta enfermedad, se basa en el hecho de que la tensión de oxígeno, a través de HIF-1 $\alpha$ , puede regular el metabolismo básico del CT, lo que contribuiría al desarrollo de las alteraciones placentarias observadas en preeclampsia.

Observamos que los CT bajo condiciones hipóxicas mantienen un fenotipo proliferativo, no invasivo y no diferenciado, características esenciales en las primeras etapas de la placentación (Genbacev et al, 1997; Huppertz et al, 2009; Rodesch et al, 1992). Sin embargo, el mantenimiento continuado de una baja concentración de oxígeno hace que proliferen de manera descontrolada, lo que provoca un incremento de la apoptosis de estas células que contribuiría a alteraciones en la placentación (DiFederico et al, 1999). Por otro lado, se ha demostrado que HIF-1 $\alpha$  reduce la capacidad invasora del trofoblasto a través de la activación de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta-3 (TGF $\beta$ -3) y cuya síntesis aumenta en condiciones de baja concentración de oxígeno (Caniggia et al, 2000). Además, la hipoxia también puede alterar el proceso de invasión celular mediante modificaciones en el patrón normal de cambio de integrinas citotrofoblásticas, lo que alteraría el proceso de pseudo-vasculogénesis (Genbacev et al, 1996; Genbacev et al, 1997).

Consecuentemente, el ambiente hipóxico generado en placentas durante la preeclampsia podría ser responsable de alteraciones en las funciones básicas de los

citotrofoblastos, lo que daría lugar a un remodelado defectuoso de las arterias espirales. A su vez, estas alteraciones en el remodelado arterial, parecen tener como consecuencia una disminución de la perfusión sanguínea hacia el espacio intervilloso, que ocasiona isquemia placentaria (Fisher & Roberts, 1999). La falta de aporte sanguíneo hacia la placenta genera una respuesta celular regulada, en gran medida, por el aumento de los niveles de HIF-1 $\alpha$ . Según varios estudios, esta respuesta celular induce la liberación de diversos factores a la circulación materna (factores inflamatorios, anti-angiogénicos, especies reactivas de oxígeno, etc.) que contribuyen a la patogenia de la preeclampsia (Conrad & Benyo, 1997; Szpera-Gozdziewicz & Breborowicz, 2014).

Esta relación entre la isquemia placentaria y la preeclampsia se ha demostrado en diversos modelos animales (Abitbol et al, 1976a; Abitbol et al, 1976b; Combs et al, 1993; Lang et al, 2000). Se observó, que tras la reducción del flujo placentario mediante obstrucción de la arteria uterina (modelo RUPP), aparecían síntomas característicos de preeclampsia (hipertensión y proteinuria), además de un incremento en la liberación de factores soluble al plasma (sFLT1, sEng) (Gilbert et al, 2007; Gilbert et al, 2009; Li et al, 2012).

Resumiendo, podríamos afirmar que la hipoxia placentaria presente en preeclampsia parece participar en el desarrollo anómalo de la placenta, además de ser consecuencia del mismo, ya que este desarrollo anómalo da lugar a una hipoperfusión sanguínea que genera un ambiente hipóxico que favorece el desarrollo de la sintomatología clínica.

### 3. Estrés oxidativo

La generación de radicales libres, como son las especies reactivas de oxígeno, ROS, es un proceso natural resultante de numerosas reacciones enzimáticas fisiológicas. Bajo situaciones de hipoxia o inflamación este proceso está incrementado de forma anormal y constituye uno de los mecanismos principales de daño celular, ya que los radicales libres son moléculas extremadamente reactivas (Freeman & Crapo, 1982). Cuando los niveles de ROS sobrepasan la capacidad de neutralización de los sistemas de protección fisiológicos pueden reaccionar con todo tipo de moléculas, principalmente lípidos y proteínas, alterar su composición y convertirlos a su vez en transmisores de estrés oxidativo. La desregulación en el balance entre radicales libres y factores antioxidantes contribuye al desarrollo de diversos procesos patológicos, como defectos en el desarrollo embrionario o alteraciones en el proceso de implantación o placentación (Sagol et al, 1999).

En preeclampsia se han detectado niveles elevados de ROS (Burton & Jauniaux, 2011; Redman & Sargent, 2009), que se cree que juegan un papel importante en la patogenia de esta enfermedad. El aumento en la concentración de ROS produce alteraciones metabólicas en las células de la placenta, aumenta la peroxidación lipídica y contribuyen a la liberación de restos de sincitiotrofoblastos, junto con factores pro-inflamatorios y otros factores solubles, a la circulación sanguínea (Borzychowski et al, 2006). Por otro lado, el aumento de estrés oxidativo puede estar participando en la disfunción endotelial sistémica y en el proceso de arterioesclerosis observado en estas mujeres (Victor et al, 2009). Además, los altos niveles de ROS aumenta la concentración de tromboxano A<sub>2</sub> que acentúa la vasoconstricción y la agregación plaquetaria (Al-Gubory et al, 2010; Redman et al, 2014; Walsh & Wang, 1993), contribuyendo a los síntomas de preeclampsia.

Los altos niveles de ROS presentes en esta enfermedad pueden ser debidos, en gran medida, a la alteración en la perfusión placentaria, ya que se ha demostrado que una oxigenación deficiente induce un incremento de estrés oxidativo (Hung et al, 2001; Many & Roberts, 1997). La hipoxia y el estrés oxidativo están estrechamente relacionados. Por un lado, se ha observado que un ambiente hipóxico induce incremento de los niveles de ROS, y por otro lado, se ha descrito que las ROS están contribuyendo a la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , y por tanto, al mantenimiento de la respuesta hipóxica (Chandel et al, 2000). Además, también se ha observado que el aumento de factores inflamatorios presentes en mujeres con preeclampsia favorece la formación de ROS (Lee et al, 2003; Wang & Walsh, 1996), que, a su vez, contribuyen a la liberación de factores pro-inflamatorios. Por tanto, se generaría una retroalimentación positiva, entre el aumento de estrés oxidativo, la hipoxia placentaria y el incremento de factores inflamatorios, que supondría un agravamiento de la sintomatología de esta enfermedad.

Otras potenciales fuentes de estrés oxidativo en preeclampsia, son los anticuerpos agonistas de los receptores de angiotensina II, AT1 (AA-AT1), que también están aumentados en esta enfermedad. Los AA-AT1 contribuyen a la elevación en los niveles de ROS, asociado a un incremento de la expresión de NADPH oxidasa (Dechend et al, 2003). El bloqueo de los receptores AT1 mediante el tratamiento con Losartán, agonista de estos receptores, además de reducir la presión arterial, disminuye los niveles de ROS placentarios (LaMarca et al, 2016).

Sin embargo, a pesar de las evidencias del daño generado por el aumento del estrés oxidativo en preeclampsia, en buena parte de los estudios realizados hasta la fecha el tratamiento con antioxidantes no induce una clara mejora, ni en la sintomatología ni en el grado de incidencia de la enfermedad (Duhig et al, 2016;

Poston et al, 2011), por lo que podemos deducir que el estrés oxidativo no es un factor clave en el desarrollo de la preeclampsia.

### 3.1. Oxisteroles

El colesterol es un esteroide de origen animal que cumple numerosas funciones metabólicas (Spector y col., 1985; Merrill y col., 1989; Morel y col., 1996). Cuando se oxida da origen a una serie de productos que se identifican colectivamente con el nombre de oxisteroles (Maerker y col., 1987). Estos oxisteroles están implicados en diversas enfermedades, como arteriosclerosis, trombosis o hipercolesterolemia (Schroepfer, 2000; Steck & Lange, 2010), y en numerosos procesos biológicos, como inflamación, estrés oxidativo y apoptosis (Vejux & Lizard, 2009).

El colesterol se transporta por el plasma unido a proteínas, formando las conocidas como lipoproteínas de baja densidad (LDL). Durante la gestación, se observan altos niveles de estas LDL, que son muy susceptibles a la oxidación (Anber et al, 1996; Winkler et al, 2000). En un embarazo normal, los agentes antioxidantes previenen su oxidación y toxicidad (Mueller et al, 2005). Sin embargo, en preeclampsia, la disminución de los agentes antioxidantes, el incremento de ROS, junto con la hiperlipidemia descrita, dan lugar a las altas concentraciones de LDL oxidadas (oxLDL) observadas en el plasma de estas mujeres (Bodzek et al, 2002).

Los receptores LXR<sub>s</sub>, que median la respuesta celular a los oxisteroles, están también sobre-expresados en preeclampsia y sus niveles se han correlacionado con una mayor gravedad de la enfermedad (Wang et al, 2016). Se ha demostrado que los oxisteroles están involucrados, mediante de la activación de los receptores LXR<sub>s</sub>, en la regulación del metabolismo de los trofoblastos, reduciendo su capacidad invasora (Castrillo et al, 2003; Fournier et al, 2008; Pavan et al, 2004a; Pavan et al,



2004b), sincitialización (Weedon-Fekjaer et al, 2005) y diferenciación (Aye et al, 2011). La modificación de estos procesos básicos en la placentación, sugiere la implicación de los oxisteroles en las alteraciones placentarias observadas en preeclampsia. Por otro lado, los oxisteroles han sido propuestos como biomarcadores de la enfermedad, ya que mujeres con altos niveles de oxLDL en plasma tienen un mayor riesgo de padecer preeclampsia que aquellas mujeres con niveles bajos (Qiu et al, 2006), lo que indica la implicación de estos en las primeras etapas de la enfermedad.

Por lo tanto, al igual que pasaba con la hipoxia, el aumento de oxisteroles puede ser tanto causa como consecuencia de las alteraciones placentarias descritas en preeclampsia. Por un lado, la hipoxia inducida por la hipoperfusión placentaria contribuye al incremento de estrés oxidativo, que unido al aumento de LDL circulante, resulta en un incremento en la concentración de oxisteroles (Al-Gubory et al, 2010; Redman et al, 2014). A su vez, se ha visto que los oxisteroles están alterando diversos procesos de los trofoblastos, importantes para el correcto desarrollo placentario, además de favorecer la generación de arterioesclerosis presente en arterias espirales en preeclampsia. Estos mecanismos están asociados con la reducción del flujo placentario y, por tanto, con la aparición de hipoxia, lo que da lugar a una retroalimentación positiva que contribuye a la sintomatología.

#### 4. Inflamación

Durante un embarazo normal se induce un proceso inflamatorio que está incrementado en preeclampsia (Redman et al, 1999; Redman & Sargent, 2003). En esta enfermedad se ha descrito un aumento de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), mientras que citocinas anti-

inflamatorias como interleucina 10 (IL-10) e interleucina 4 (IL-4), están disminuidas (Conrad et al, 1998; Hennessy et al, 1999; Szarka et al, 2010).

El incremento de estos factores pro-inflamatorios en placenta pueden inducir la muerte de trofoblastos y la activación de células endoteliales, lo que se asocia a la disfunción endotelial observada en preeclampsia (Chen et al, 2010). El factor TNF- $\alpha$ , así como IL-6 e IL-1 $\beta$ , incrementan la permeabilidad vascular, además de aumentar la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y activar los leucocitos (Bamforth et al, 1996; Hofmann et al, 2002; Puhlmann et al, 2005). De esta manera el reclutamiento de leucocitos por parte del endotelio estaría aumentado, lo que incrementaría la infiltración leucocitaria y el daño endotelial. Por otro lado, los factores inflamatorios estimulan la producción de ROS, disminuyen la síntesis de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), enzima responsable de la síntesis de óxido nítrico (NO), e incrementa la producción de Endotelina 1 (ET1) mediante el aumento de la síntesis de ARNm de la preproendotelina-1 (Harmon et al, 2016). Los altos niveles de ET1, que es un potente vasoconstrictor, junto con la disminución de NO, que favorece la vasodilatación, contribuirían al aumento de la presión arterial (Wilkins et al, 1995). Además, la disminución de citocinas anti-inflamatorias está relacionada con una desregulación de la respuesta inmune, que también juega un papel muy importante en el correcto desarrollo del embarazo (Wegmann et al, 1993). Por tanto, el aumento de citoquinas pro-inflamatorias y la disminución de anti-inflamatorias contribuyen al desarrollo de las alteraciones presentes en esta enfermedad.

En relación al origen de la inflamación en preeclampsia, se cree que el estrés oxidativo generado es uno de los principales responsables del aumento de la respuesta inflamatoria. Oxisteroles como 25-hidroxicolesterol y 7-ketolesterol,

promueven la liberación de IL-6 y TNF- $\alpha$ , (Aye et al, 2012). Por otro lado, se ha observado, que la activación de los receptores AT1 por parte de AA-AT1, además de estar asociado con el incremento de estrés oxidativo, induce la activación de factores de transcripción de citocinas pro-inflamatorias, tanto en el endotelio como en células trofoblásticas (Dechend et al, 2003; LaMarca et al, 2016; LaMarca et al, 2012; LaMarca et al, 2011). A su vez, la respuesta inflamatoria puede incrementar el estrés oxidativo. Las ROS, son consideradas como segundos mensajeros en la propagación del estímulo inflamatorio (Hensley et al, 2000). Además, se ha descrito que citoquinas inflamatorias, como NF $\kappa$ B y TNF- $\alpha$ , favorecen el aumento de HIF-1 $\alpha$  (Gorlach & Bonello, 2008; Taylor, 2008)

Por tanto, como ya comentamos, el aumento de hipoxia, ROS e inflamación en preeclampsia parecen estar estrechamente relacionados.

## 5. Disfunción endotelial

Uno de los tejidos más afectados en preeclampsia es el endotelio. Cambios en la estructura y función del endotelio materno debidos a alteraciones en la reactividad vascular, activación de la cascada de coagulación, etc., tienen como consecuencia la disfunción endotelial sistémica observada en esta enfermedad (Roberts, 1998; Roberts & Cooper, 2001).

Diversos marcadores de activación y daño endotelial están presentes en el plasma de estas mujeres, como el factor von Willebrand, factores solubles relacionados con la angiogénesis (sFlt1, sEng) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Sircar et al, 2015). Además, factores vasoconstrictores liberados por las células endoteliales, como ET1, tromboxano A<sub>2</sub> y noradrenalina están

aumentados en preeclampsia, mientras que los niveles de factores vasodilatadores, como prostaglandina  $I_2$  ( $PGI_2$ ) y NO están disminuidos en comparación con un embarazo normal (Karumanchi et al, 2005).

Como ya hemos comentado, tanto las citocinas pro-inflamatorias, como el incremento de ROS, contribuyen a la disfunción endotelial mediante alteraciones estructurales de células endoteliales, cambios en la permeabilidad vascular, aumento de infiltración leucocitaria, reducción en los niveles de factores vasodiladores como NO, incremento de tromboxano, ET1, etc. (Al-Gubory et al, 2010; Bamforth et al, 1996; Harmon et al, 2016; Hofmann et al, 2002; Puhlmann et al, 2005; Redman et al, 2014; Walsh & Wang, 1993).

Por otro lado, factores como el factor de crecimiento vascular, VEGF y el factor de crecimiento placentario, PlGF, importantes para el desarrollo de la vasculatura de la placenta (Brennan et al, 2014; Marzioni et al, 2005), están disminuidos en el plasma de mujeres con preeclampsia (Levine et al, 2004; Polliotti et al, 2003; Taylor et al, 2003). Además, se han encontrado altos niveles de los factores solubles sFlt1 y sEng (Levine et al, 2006; Lopez-Novoa, 2007; Maynard et al, 2003; Venkatesha et al, 2006), comúnmente conocidos como factores anti-angiogénicos (Maynard et al, 2003; Venkatesha et al, 2006).

El factor sFlt1 es un fragmento soluble del receptor de VEGF y PlGF, de manera que el exceso del mismo podría estar interaccionando con estos ligandos, evitando así la unión de VEGF y PlGF a sus receptores de membrana, lo que inhibiría, por tanto, la activación de la señalización celular. De la misma manera, se cree que sEng podría unirse al factor de crecimiento transformante  $TGF\beta$ , implicado en el proceso angiogénico, y bloquear su efecto (Lam et al, 2005; Levine et al, 2004; Maynard et al, 2003; Venkatesha et al, 2006). Sin embargo, estas afirmaciones despiertan

muchas controversias. A pesar de que diversos estudios muestran una correlación negativa entre los niveles de sFlt1 y sEng y la concentración de ligandos libres, VEGF, PlGF y TGF $\beta$ , respectivamente, en ninguno de ellos se ha demostrado la unión específica entre estos factores solubles y sus ligandos. Además, el papel anti-angiogénico asignado a sFlt1 y sEng únicamente se ha demostrado en modelos *in vitro* (Castonguay et al; Maynard et al, 2003; Venkatesha et al, 2006)

Existen numerosos estudios que afirman que estos factores están elevados en el plasma antes de la manifestación de la sintomatología clínica de preeclampsia, y además se correlacionan con una mayor gravedad y peor pronóstico de la enfermedad (Farina et al, 2008; Levine et al, 2006; Lopez-Novoa, 2007; Maynard et al, 2003; Purwosunu et al, 2008; Troisi et al, 2008; Venkatesha et al, 2006), a pesar de que, tanto la función, como la regulación de la liberación al plasma de sFlt1 y sEng no están aún bien clarificadas

Por tanto, el objetivo que nos planteamos en este trabajo es intentar elucidar el papel que juega la sEng en la fisiopatología de la preeclampsia, con el fin de definir mejor algunos de los procesos que tienen lugar en esta compleja enfermedad.

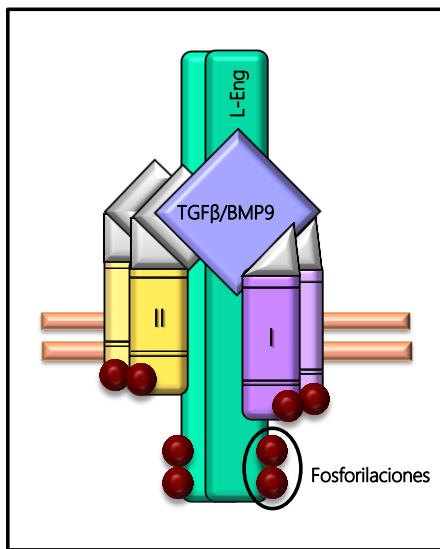
## Endoglina

### 1. Estructura y mecanismo de acción

Endoglina (Eng), también conocida como CD105, es una glicoproteína de membrana homodimérica de 180 kDa formada por dos subunidades de 90 kDa cada una unidas por puentes disulfuro (Gougos & Letarte, 1990). Se expresa

predominantemente en el endotelio y es considerada como un marcador de células endoteliales (Gougos & Letarte, 1988; Graulich et al, 1999). Además, Eng también se expresa en altas cantidades en otros tipos celulares, como en los sincitiotrofoblastos (Gougos et al, 1992; St-Jacques et al, 1994).

Endogлина actúa como receptor auxiliar o receptor de tipo III de la superfamilia de citocinas de TGF $\beta$ . El dominio extracelular de la Eng cuenta, hacia el extremo N-terminal, con la secuencia de unión al ligando y una secuencia de interacción proteína-proteína. A través de esta secuencia de unión proteína-proteína, se favorece la estabilización del complejo de receptores que se forma tras la llegada del ligando, lo que permite la fosforilación de los residuos intracelulares específicos, y por tanto, la activación de la cascada de señalización al interior celular. Endogлина carece de actividad enzimática por lo que no es capaz de activar por sí sola ninguna vía de señalización, aunque sí de modular la señal, ya que en su dominio intracelular existen residuos susceptibles de ser fosforilados, así como regiones claves de interacción con otras proteínas que pueden estar participando o interfiriendo en la cascada de señalización (FIGURA 9) (Bernabeu et al, 2009; Lopez-Novoa & Bernabeu, 2010; Nunez-Gomez et al, 2016)



**FIGURA 9:** Complejo de receptores

Complejo de receptores formado tras la unión del ligando (TGF- $\beta$  o BMPs) a los receptores tipo I y II y el posterior reclutamiento del receptor tipo III o auxiliar, endoglina. Una vez formado este complejo, tiene lugar la fosforilación en sitios específicos del dominio intracelular.

Existen varias isoformas distintas de Eng: Endoglina larga (L-Eng), endoglina corta (S-Eng), ambas proteínas integrales de membrana, y endoglina soluble (sEng). En el hombre y en el ratón, la L-Eng, es la isoforma mayoritaria y presenta un dominio intracelular más largo, mientras que la S-Eng, más minoritaria, carece de gran parte de este dominio. Las isoformas L-Eng y S-Eng se generan mediante *splicing* alternativo, ya que si, durante el proceso de transcripción génica no se elimina el último intrón, aparece un codón de parada prematuro y el ARNm resultante da lugar a una proteína más corta, S-Eng (Bellon et al, 1993; Perez-Gomez et al, 2005). Por el contrario, la isoforma soluble, sEng, no está anclada a la membrana debido a que carece del dominio transmembrana e intracelular. Se trata de una proteína soluble correspondiente al fragmento extracelular de la proteína de membrana, que podría ser liberado al medio externo mediante un corte proteolítico llevado a cabo por enzimas metaloproteinasas (Hawinkels et al, 2010).

## 2. Función de la endogлина en la fisiología vascular

Se ha observado que la expresión de Eng aumenta en células endoteliales de zonas donde tiene lugar una angiogénesis activa (Anderberg et al, 2013; Barnett et al, 2014; Burrows et al, 1995; Park et al, 2013). Endogлина, es esencial para la correcta neovascularización, como se ha demostrado en los pacientes que sufren telangiectasia hemorrágica hereditaria 1, HHT1. Esta enfermedad se produce por mutaciones en el gen de Eng (*ENG*) y se caracteriza por anomalías vasculares, como malformaciones arteriovenosas, edema pulmonar y hepático, hemorragias y problemas cerebrovasculares (Sabba et al, 2006). Por otro lado, ratones *knock-out* para el gen *Eng* mueren durante el desarrollo embrionario debido a alteraciones en la vascularización del saco vitelino, desarrollo del corazón y otros problemas del crecimiento, mientras que ratones heterocigóticos en *Eng*, que son haploinsuficientes para este gen, desarrollan malformaciones arteriovenosas y otros defectos vasculares similares a los de los pacientes con HHT-1 (Bourdeau et al, 1999; Bourdeau et al, 2000; Srinivasan et al, 2003).

Otra de las funciones atribuidas a Eng es su implicación en el control del tono vascular. Se ha observado, que los ratones heterocigotos para el gen de Eng, tienen una menor capacidad de respuesta al estímulo vasodilatador de acetilcolina o bradicinina. Esto parece basarse en la menor producción de NO debido a una reducción en los niveles de eNOS (Jerkic et al, 2004; Jerkic et al, 2006), o bien a un “desacoplamiento” de esta enzima, es decir, que eNOS no se encuentra unida a su cofactor Hsp90, lo que conlleva a un incremento en la producción de radicales libres y a un reducción de la síntesis de NO (Toporsian et al, 2005).

Endogлина, también está afectando a la permeabilidad vascular. La haploinsuficiencia de endogлина se ha relacionado con una alteración en los niveles



de VEcadherina (Jerkic & Letarte, 2015), además de una disminución de la expresión de  $\beta$ -catenina, CD31 (PECAM) y ZO-1 (Park et al, 2013).

Viendo la asociación de Eng con diversas patologías relacionadas con el sistema cardiovascular (HHT, hipertensión pulmonar, arterioesclerosis y preeclampsia), parece claro que es una proteína imprescindible para la correcta angiogénesis, y ejerce un papel importante en la regulación del tono vascular (Ikemoto et al, 2012; Kapur et al, 2013).

Sin embargo, no todas las isoformas de endoglina ejercen el mismo papel. Diversos estudios sugieren que la isoforma S-Eng actúa como una molécula anti-angiogénica. Ratones que sobre-expresan S-Eng (*S-Eng+*) presentan un retraso en el crecimiento tumoral, similar al observado en ratones deficientes de endoglina (Duwel et al, 2007). Además, en estos ratones, la sobre-expresión de S-Eng induce un aumento de presión arterial debido a un defecto en la respuesta de vasorrelajación (Blanco et al, 2008; Perez-Gomez et al, 2005; Quintanilla et al, 2003).

Una posible hipótesis es que, al carecer del dominio intracelular, o de la mayor parte del mismo, y por tanto, de los sitios de fosforilación, S-Eng podría actuar como un dominante negativo del efecto de L-Eng. Esta isoforma formaría heterodímeros con la isoforma larga, o incluso competiría con ella por la unión al complejo de receptores modificando de esta manera la modulación de la transmisión de la señal.

## Endoglina soluble

### 1. Estructura y expresión

Como ya comentamos, la isoforma soluble de endoglina, sEng, es una proteína soluble que se corresponde con la región extracelular, N-terminal, de endoglina de membrana. En la población normal aparece en plasma en bajas concentraciones y aumentada en diversas patologías, como preeclampsia, leucemia mieloide aguda (AML), distintos tipos de tumores sólidos y cardiomiopatía dilatada (CMD), donde los niveles de sEng están asociados a un peor pronóstico (Bernabeu et al, 2009; Cruz-Gonzalez et al, 2008; Perez-Gomez et al, 2007). Además, en pacientes con diabetes e hipertensión, la presencia de altas concentraciones de sEng se ha relacionado con alteraciones cardiovasculares (Blazquez-Medela et al, 2010).

Se ha propuesto, que endoglina soluble se genera mediante corte proteolítico de endoglina de membrana por la metaloproteinasa MMP14 o MT1-MMP en la posición 586-587, próximo al dominio transmembrana, liberando al medio un fragmento de aproximadamente 80 kDa que engloba casi todo el dominio extracelular (Hawinkels et al, 2010; Kaitu'u-Lino et al, 2012). Sin embargo, en un estudio donde se purificó sEng del plasma de mujeres con preeclampsia, se observó una banda de 65 kDa. Mediante espectrofotometría de masas, se observó que la secuencia de sEng se extendía al menos, hasta el residuo 406 de Arginina. Aunque no se pudo localizar el extremo C-terminal, probablemente se sitúe poco después de este residuo, por lo que no podría proceder del corte proteolítico en la posición 586-587 (Gregory et al, 2014). Con el fin de profundizar en el papel que juega sEng en preeclampsia, sería importante conocer el mecanismo de generación de sEng en

placenta, su estructura y su secuencia exacta, ya que parece que el mecanismo de liberación de sEng varía dependiendo del tipo de tejido y de órgano donde proceda, es decir, del tipo de patología, dando lugar a sEng de diferentes tamaños proteicos.

## 2. Regulación de la liberación de sEng en preeclampsia

Generalmente se ha relacionado el incremento de la expresión de Eng con la liberación de sEng al medio, ya que, como hemos dicho, la teoría más aceptada es que esta proviene del corte de la isoforma de membrana. Por tanto, para el estudio de la regulación de la liberación de sEng, analizaremos además, los procesos por los cuales se ve incrementada Eng de membrana.

### 2.1. Ambiente hipóxico

La hipoxia es uno de los inductores de la síntesis de Eng de membrana más estudiados. HIF-1 $\alpha$  aumenta sus niveles en condiciones de baja concentración de oxígeno y actúa como factor de transcripción de gran cantidad de genes, entre los que se encuentra el gen de Eng (*ENG*). En el promotor de *ENG* se han identificado secuencias de respuesta a hipoxia, HRE, que unen HIF-1 $\alpha$  y, por tanto, modulan la expresión génica en respuesta a hipoxia.

Endoglina puede estar aumentada en ambientes hipóxicos también de manera indirecta, mediante el aumento de expresión de ligandos de la familia de TGF $\beta$ , cuyos genes también presentan elementos de respuesta a HIF-1 $\alpha$  (Luan et al, 2015;

Sanchez-Elsner et al, 2002; Tseng et al, 2010), o mediante la activación de la vía de MAPK (Zhu et al, 2003). Ambos procesos aumentan la expresión de Eng.

El incremento de Eng de membrana en condiciones de hipoxia es un hecho generalmente aceptado (Li et al, 2003; Park et al, 2013). Sin embargo, existen controversias en la relación entre la hipoxia y la liberación de sEng en placenta, ya que se han obtenido diferentes resultados en los distintos modelos estudiados. En un modelo *in vivo* de preeclampsia, en el cual se genera una hipoxia local mediante la reducción de la perfusión uterina (modelo RUPP), se han encontrado niveles elevados de HIF-1 $\alpha$  y de sEng en plasma (Gilbert et al, 2009). Experimentos *in vitro* con trofoblastos, demuestran que la hipoxia contribuye a la liberación de sEng al medio por parte de estas células (Valbuena-Diez et al, 2012). Explantes placentarios mantenidos a una concentración del 3% de O<sub>2</sub> liberan mayor cantidad de sEng que los mantenidos al 20% de O<sub>2</sub>, lo que se ha asociado a una activación de la vía de señalización del TGF $\beta$ -3, ya que su síntesis está estimulada en condiciones hipóxicas (Yinon et al, 2008). Por otro lado, trofoblastos procedentes de pacientes con preeclampsia, liberan significativamente más sEng al medio bajo condiciones de hipoxia que bajo condiciones de normoxia (Gu et al, 2008).

Sin embargo, existen otros estudios que no demuestran esta idea. Se ha observado que los trofoblastos procedentes de mujeres sanas, presentan la misma tasa de liberación de sEng bajo condiciones de normoxia e hipoxia (Gu et al, 2008). Del mismo modo, un estudio realizado en explantes procedentes de placentas sanas, no presentaron un aumento en la liberación de sEng tras someterlos a una concentración de 1% de O<sub>2</sub> durante 48h (Munaut et al, 2008). Aoki y cols, demostraron que el tratamiento de células de coriocarcinoma humano con suero procedente de mujeres con preeclampsia, bajo condiciones de normoxia, induce un

incremento en la concentración de sEng en el medio, por lo que además del estímulo hipóxico, existen otros factores, presentes en el plasma de estas mujeres, que están participando en la generación de sEng en preeclampsia (Aoki et al, 2012). Por otro lado, Redman y Sargent sugieren que el incremento de sEng observado en presencia de concentraciones bajas de oxígeno, no es consecuencia directa de la hipoxia, sino que está mediado por el estrés oxidativo y la inflamación, inducidos por este ambiente hipóxico (Redman & Sargent, 2009). Por tanto, el papel de la hipoxia en la liberación de sEng en placenta no está del todo claro. La hipoxia podría estar induciendo al incremento de sEng, sin embargo, parecen necesarias otras alteraciones previas que participen en esta liberación.

## 2.2. Oxisteroles

Como ya hemos comentado previamente, en el plasma de mujeres con preeclampsia se han detectado altas concentraciones de oxisteroles y de sus receptores LXRs (Bodzek et al, 2002; Wang et al, 2016). Cuando estos receptores son activados, forman un heterodímero con los receptores X retinoides, RXRs, que actúa como factor de transcripción, por lo que regula la expresión de diferentes genes, entre los que se encuentra el gen de Eng (Henry-Berger et al, 2008; Janowski et al, 1999).

En nuestro laboratorio, en colaboración con el laboratorio del Dr. Carmelo Bernabeu del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de Madrid, hemos demostrado que altos niveles de oxisteroles estimulan la liberación de sEng a través de la activación de los receptores LXRs. Según estos resultados, esto tiene lugar debido a un incremento en la síntesis de Eng de membrana junto con un aumento, tanto de los niveles de expresión como de actividad de la MMP14 (Valbuena-Diez et al, 2012).

### 2.3. Factores Inflamatorios

Como hemos expuesto anteriormente, la respuesta inflamatoria normal que se induce durante la gestación, está incrementada en preeclampsia (Redman et al, 1999; Redman & Sargent, 2003).

El tratamiento de explantes placentarios con las citocinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (interferón gamma), incrementa la concentración de sEng. Se cree que puede ser debido a la inhibición, por parte de estas citocinas, de la enzima HO-1 (Hemo oxigenasa-1) (Cudmore et al, 2007). Esta enzima, además de catalizar la oxidación del grupo hemo y favorecer la síntesis de antioxidantes, se ha relacionado con la inhibición de la liberación de factores solubles como sFlt1 y sEng. Se cree que en preeclampsia los niveles de esta enzima están reducidos, por lo que se ha relacionado con la mayor concentración de sFlt1 y sEng en plasma (Cudmore et al, 2007).

Por otro lado, se observó que, tras la administración de AA-AT1 en ratas no preñadas, se producía un incremento de la presión arterial y sEng en plasma (LaMarca et al, 2012). La activación de los receptores AT1 por parte de los anticuerpos AA-AT1, incrementan la liberación de TNF- $\alpha$ . Por tanto, apoyándonos en la anterior hipótesis de que TNF- $\alpha$  es un regulador negativo de la enzima HO-1, el incremento de sEng observado tras el tratamiento con AA-AT1 podría estar regulador por la inhibición de la enzima HO-1 por el aumento de TNF- $\alpha$  (Zhou et al, 2010).

### 2.4. Muerte de trofoblastos

Durante el embarazo, en la circulación materna existe un aumento de fragmentos celulares procedentes del epitelio sincitial de la placenta, que están

aumentados significativamente en preeclampsia. Se cree que el daño celular inducido en preeclampsia por los factores inflamatorios o el estrés oxidativo, da lugar a un aumento de la muerte celular y, como consecuencia, a la liberación de fragmentos celulares a la circulación materna (Goswami et al, 2006; Knight et al, 1998; Redman et al, 2012).

Diversos estudios han asociado el aumento de estos fragmentos con la aparición de alteraciones en el estado inflamatorio (Germain et al, 2007; Messerli et al, 2010), en el sistema inmune (Holder et al, 2012; Sabapatha et al, 2006), daño endotelial (Gupta et al, 2005; Smarason et al, 1993), etc., y a su vez, como ya hemos descrito, estos procesos inducen un aumento de la muerte celular. Además, se ha demostrado recientemente, que la administración crónica de fragmentos procedentes de la necrosis trofoblástica, inducen un incremento en la presión arterial en ratas (Lau et al, 2013), y alteraciones de la vaso-relajación arterial (Cockell et al, 1997).

Por otro lado, Tannetta y cols observaron que los fragmentos de sincitiotrofoblastos circulantes expresaban Eng y Flt1, y consecuentemente, el aumento de estos fragmentos podría estar bloqueando la unión de sus ligandos a los receptores de membrana, y por tanto, inhibiendo su señalización celular (Tannetta et al, 2013). Esto nos lleva a pensar que estos fragmentos procedentes de la muerte celular del sincitiotrofoblastos están contribuyendo al aumento de Eng circulante en el plasma de estas pacientes, lo que tendría un efecto a nivel fisiológico similar al aumento plasmático de sEng.

Como resumen de todo este apartado, podemos decir que parece existir una gran variedad de procesos involucrados en la estimulación de la liberación de sEng. Todos estos procesos parecen estar relacionados entre sí, lo que conlleva a la

estabilización del daño característico de preeclampsia. Probablemente sea la generación de este ambiente alterado, por parte del conjunto de estos procesos, el responsable de la liberación de sEng. A su vez, sEng puede estar regulando muchos de estos procesos, por lo que se generaría una retroalimentación positiva que contribuye a la patogenia de la preeclampsia.

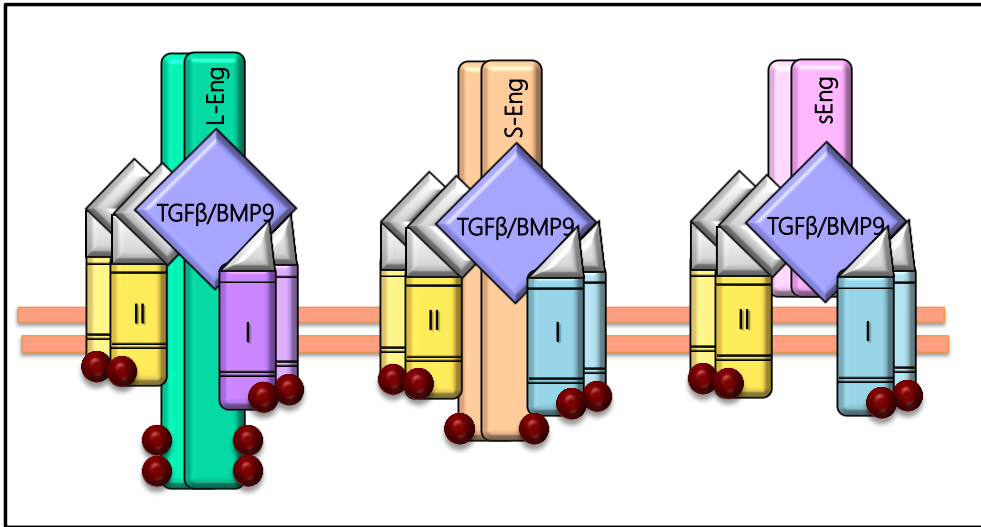
### 3. Mecanismo de acción de sEng

A pesar de su asociación con diversas patologías relacionadas con el sistema cardiovascular, el mecanismo de acción de sEng aún no ha sido bien definido. Una de las teorías comúnmente aceptada, es que sEng ejerce su acción mediante la inhibición de la ruta de señalización de TGF $\beta$ .

Como ya hemos visto, Eng de membrana actúa como modulador de esta vía de señalización, interaccionando con el ligando y con el resto de receptores mediante su dominio extracelular. Por lo tanto, se sugiere que el exceso de sEng podría interaccionar con el ligando TGF $\beta$  y antagonizar su unión a los receptores de membrana (Venkatesha et al, 2006). Sin embargo, se ha demostrado que Eng, por sí sola, no puede unirse a TGF $\beta$ , si no que requiere de la interacción con los otros receptores del complejo, T $\beta$ RI y T $\beta$ RII (receptores tipo I y tipo II) (Barbara et al, 1999).

Podría ser cierto que sEng estuviera modificando la señalización a través de TGF $\beta$ , pero interaccionando con el complejo de receptores formado tras la unión del ligando, y no mediante unión directa al mismo (FIGURA 10.A). En este caso, al carecer del dominio citoplasmático, sEng actuaría de manera similar que endoglinacorta (S-Eng), modificando la señal al interior celular.





**FIGURA 10:** Mecanismo de acción de sEng

**A.** Interacción de sEng con el complejo de receptores de membrana tras la unión del ligando, lo que bloquea la unión de este con Eng de membrana. **B.** Interacción de sEng con el complejo de receptores solubles, lo que bloquea la unión del ligando a los receptores de membrana. **C.** Interacción de sEng con los ligandos BMPs lo que antagoniza la unión de dichos ligandos a los receptores de membrana.

Otra posibilidad, es que se forme un complejo entre sEng y el receptor soluble de tipo I o II de TGFβ (sEng-sTβRI o sEng-sTβRII) y bloqué la interacción con los receptores de membrana e inhiba su señalización (FIGURA 10.B). Por otro lado, se ha demostrado que sEng interacciona más afínmente con otros ligandos de la familia de TGFβ, como las proteínas morfogénicas del hueso, BMPs. Estos ligandos se unen a sEng con la misma afinidad que a su receptor de membrana tipo I, por lo que el exceso de sEng podría bloquear su señalización al unirse a ellos e impedir, de esa manera, su interacción a los receptores de membrana (FIGURA 10.C) (Barbara et al, 1999; Gregory et al, 2014).

## 4. Papel de sEng en preeclampsia

### 4.1. Biomarcador

En un embarazo normal existe un aumento de los niveles plasmáticos de sEng en los dos últimos meses de gestación (Venkatesha et al, 2006). En las mujeres que desarrollan preeclampsia, este aumento ocurre de manera más temprana y mucho más pronunciada, de manera que pueden detectarse niveles elevados de sEng en plasma antes de la manifestación de los síntomas clínicos (Levine et al, 2006; Maynard et al, 2010). Por ello, se ha determinado que los niveles plasmáticos de sEng actúan como biomarcador de esta enfermedad (Lopez-Novoa, 2007).

Los niveles plasmáticos de sEng también se han correlacionado con un peor pronóstico, siendo significativamente mayores en pacientes con eclampsia o síndrome de HELLP (Venkatesha et al, 2006) y en preeclampsia temprana (Maynard et al, 2010), que se corresponden con las formas más graves de la enfermedad.

Existen numerosos trabajos que defienden el papel predictivo de los niveles de sEng en preeclampsia. Sin embargo, el incremento de estos niveles también aparece en otras patologías, como hipertensión gestacional o hipertensión crónica (Salahuddin et al, 2007). Por ello, para una mejor predicción, se ha planteado la medición de sEng junto con otros factores, como la concentración de sFlt1, PlGF, TGF $\beta$  (Lim et al, 2008), el ratio sFlt1:PlGF (Levine et al, 2006), los niveles del receptor LXR (Wang et al, 2016), o los niveles de DNA libre fetal (AbdelHalim et al, 2016). De esta manera, la aproximación a la hora de predecir el riesgo de padecer preeclampsia es mucho más fiable y específica.

## 4.2. Hipertensión

El aumento de los niveles de sEng se ha relacionado con un incremento de la presión arterial. La administración en ratas preñadas de un adenovirus que contiene un fragmento de ADN que codifica para sEng, produce un aumento de la presión arterial (Venkatesha et al, 2006). En nuestro laboratorio, hemos comprobado que ratones transgénicos que sobre-expresan sEng humana en plasma (*sol.Eng*<sup>+</sup>), tienen una presión arterial mayor que sus controles (Nemeckova et al, 2015; Valbuena-Diez et al, 2012). También comprobamos, que la administración de oxisteroles a ratones, induce, a través de la activación de los receptores LXR, un aumento de presión arterial, que se corresponde con un aumento de sEng en plasma. Tras tratar a estos ratones con un péptido que compite con Eng de membrana por el corte proteolítico llevado a cabo por la metaloproteinasa MMP14, se reduce la liberación de sEng y, consecuentemente, la presión arterial (Valbuena-Diez et al, 2012).

Hasta la fecha, el efecto hipertensor de sEng se ha asociado a una reducción en la síntesis de NO, que es un potente vasodilatador, lo que contribuiría al incremento de la presión arterial (Venkatesha et al, 2006). El tratamiento con TGFβ, en presencia de Eng de membrana, induce un aumento de expresión eNOS y de la producción de NO, en células endoteliales (Jerkic et al, 2004; Jerkic et al, 2006; Santibanez et al, 2007). Se ha sugerido que en preeclampsia, la presencia de sEng modifica la señalización mediada por TGFβ, lo que reduce la síntesis de NO (Venkatesha et al, 2006). Sin embargo, esta hipótesis únicamente ha sido comprobada por el grupo de Karumanchi, en un modelo *in vitro* con células endoteliales y anillos de aorta de ratón, pero en ningún caso se demuestra la interacción directa entre sEng y TGFβ (Venkatesha et al, 2006).

### 4.3. Proteinuria

La presencia de proteínas en la orina, conocida como proteinuria, es otra de las manifestaciones clínicas características de la preeclampsia. La proteinuria se asocia generalmente a un daño en los capilares glomerulares, denominado “endoteliosis”. La endoteliosis consiste en una alteración de las células endoteliales con pérdida del epitelio fenestrado en esos capilares, depósitos de fibrinógeno y aumento del contenido lipídico de las células mesangiales (Krane & Hamrahan, 2007).

La proteinuria observada en las pacientes con preeclampsia se asocia también a la aparición en la orina de un número anormalmente alto de podocitos (Craici et al, 2013; White et al, 2014). Los podocitos, que son las células que rodean los capilares glomerulares, juegan un papel importante en el mantenimiento de la barrera de filtración, impidiendo el paso de macromoléculas (Smeets & Moeller, 2012). El desprendimiento de los podocitos del glomérulo hacía la orina, conocido como podocituria, hace que se produzcan alteraciones en el filtrado, y como consecuencia, la aparición de proteinuria (Aita et al, 2009; Henao & Saleem, 2013). Ha sido descrito un aumento de podocitos en la orina, al final del segundo trimestre, en mujeres que posteriormente desarrollaron preeclampsia. Este aumento se detectó antes de la aparición de los síntomas clínicos, por lo que dicha podocituria podría tener valor predictivo en el diagnóstico de esta enfermedad (Craici et al, 2013).

La contribución de sEng a la aparición de proteínuria no está aún muy claro. En ratas a las cuales se les ha administrado un adenovirus que induce sobre-expresión de sEng, se observa un aumento de la excrección de proteínas en orina, además de endoteliosis glomerular y otras lesiones renales presentes en preeclampsia (Venkatesha et al, 2006).

Recientes estudios realizados en nuestro grupo de investigación, han demostrado que el dominio extracelular de Eng puede interaccionar con integrinas presentes en el endotelio, lo que bloquea la unión de los leucocitos a estas integrinas y, por tanto, interfiere en el proceso de infiltración leucocitaria (Rossi et al, 2013). Basándonos en estos resultados, planteamos la hipótesis de que sEng, mediante un mecanismo similar, podría ser capaz de interaccionar con las integrinas presentes en la membrana plasmática de los podocitos, lo que impide su asociación con las lamininas de la membrana basal del glomérulo, uno de los mecanismos básicos de unión del podocito a la membrana basal. (Sachs & Sonnenberg, 2013). Este hecho podría hacer que se desprendieran, lo que incrementaría la podocituria. Comprobamos esta hipótesis usando el modelo animal antes descrito, ratones transgénico que sobre-expresa grandes cantidades de sEng humana en plasma (*sol.Eng*<sup>+</sup>), y observamos un aumento de podocituria en orina y una disminución del número de podocitos glomerulares, en comparación con sus controles (Rossi et al, 2016).

Como conclusión, basándonos en estas evidencias, deducimos que sEng podría ser responsable, al menos en parte, de la aparición de los principales síntomas de preeclampsia: hipertensión y proteinuria, aunque el mecanismo por el cual sEng induce esos efectos no está claramente demostrado.

#### 4.4. Estado inflamatorio

Otra de las alteraciones presentes en preeclampsia es un aumento de citocinas inflamatorias (Conrad et al, 1998; Hennessy et al, 1999; Szarka et al, 2010). Según Varejckova y cols, sEng se asocia con la liberación de estas citocinas inflamatorias en células endoteliales (Varejckova et al, 2017). Por medio de la modificación de la vía de señalización de TGF $\beta$ , sEng estimula la expresión de NF $\kappa$ B, que, a través de su

vía de señalización, activa la expresión de estas citocinas (Libermann & Baltimore, 1990).

Por otro lado, el trabajo realizado por Rossi y cols, sugiere que sEng podría estar inhibiendo la extravasación leucocitaria antagonizando la unión de estos leucocitos al dominio extracelular de Eng de membrana. Según este artículo, las citocinas liberadas ante un estímulo inflamatorio activan la transmigración leucocitaria mediante la interacción del dominio extracelular, RGD, de Eng de membrana con las integrinas de los leucocitos, lo que favorecería su extravasación. El aumento de sEng competiría con Eng por la unión a las integrinas, por lo que la sobreexpresión de sEng inhibiría la extravasación leucocitaria, crucial en el proceso inflamatorio (Rossi et al, 2013).

Sin embargo, estos estudios del efecto de sEng sobre el estado inflamatorio, únicamente han sido demostrados en modelos *in vitro* de células endoteliales, por lo que habría que ser cuidadosos a la hora de extrapolar estos resultados a lo que ocurre en preeclampsia. No existen evidencias del efecto de sEng sobre la inflamación a nivel placentario o en modelos animales de preeclampsia, por lo que serían necesarios estudios más exhaustivos que clarifiquen el papel que juega sEng en el incremento de inflamación observado en esta enfermedad.

#### 4.5. Alteraciones en la placentación

Como ya hemos explicado anteriormente, en preeclampsia, durante el proceso de placentación, tiene lugar una serie de alteraciones, como defectos en el remodelado de las arterias espirales y aparición de arterioesclerosis. Existen varias hipótesis que señalan el posible papel de sEng en estos procesos, aunque pocos

estudios demuestran esta relación, y en ninguno ellos ha sido comprobada en un modelo *in vivo*.

Por un lado, Nakashima y cols afirman que sEng reduce la invasión de los trofoblastos evCT y lo asocian a una inhibición del proceso de autofagia bajo un ambiente hipóxico. La autofagia es un proceso esencial para la correcta función de evCT y su inhibición resulta en una alteración en el remodelado vascular (Nakashima et al, 2013). Así mismo, Dong y cols, observaron una disminución de la capacidad invasora de trofoblastos, procedentes de placentas del primer trimestre de gestación, que fueron tratadas con sEng, asociada a una reducción en la expresión de metaloproteinasas (Dong et al, 2011). Sin embargo, en otro estudio realizado por Mano y cols, se observa que el tratamiento con sEng no modifica la invasión de evCT humanos (HTR-8/SVneo) (Mano et al, 2011). Por otro lado, Cannigia y cols, realizaron un estudio en el que trataron explantes placentarios, de 5-8 semanas de gestación, con un anticuerpo monoclonal contra Eng, viendo que se producía un incremento en la proliferación y migración celular. Sugirieron que, Eng, a través de la activación de la señalización de la vía de TGF $\beta$ , induce la inhibición de la diferenciación de evCT, y por tanto, la reducción de su capacidad invasora (Caniggia et al, 1999; Caniggia et al, 1997). Sin embargo, el anticuerpo anti-endogлина empleado en estos experimentos se une al dominio extracelular, por lo que también podría estar bloqueando el efecto de sEng sobre el metabolismo del trofoblasto, por tanto debemos tener cuidado a la hora de interpretar estos resultados.

Endogлина soluble también podría estar participando en la aparición de arterioesclerosis en las arterias placentarias en preeclampsia, ya que se ha descrito una sobre-expresión, tanto de Eng de membrana como sEng, en patologías como

arterioesclerosis u otras enfermedades coronarias (Li et al, 2000; Pardali & Ten Dijke, 2012), aunque se desconoce su función en estas enfermedades.

En resumen, la implicación de sEng en el proceso de placentación no está bien definida, y aunque hay algunas hipótesis al respecto, no hay demostraciones empíricas de su papel en este proceso. La mayoría de estudios asocian el efecto de sEng a un estadio más tardío de la enfermedad, una vez formada la placenta, relacionado con la respuesta sistémica materna, por lo que en este sentido, aún quedan muchas incógnitas que resolver.

## Modelos animales de preeclampsia

Una de las causas del desconocimiento de la etiología y el desarrollo de la preeclampsia, son las dificultades que encontramos a la hora del estudio de esta enfermedad. Uno de los principales problemas es la de obtención de muestras en etapas tempranas de gestación para el estudio del origen y desarrollo de la misma. Además, al tratarse de una enfermedad multifactorial en la que intervienen gran cantidad mecanismos, la extrapolación de los resultados obtenidos, tras el empleo de modelos *in vitro* e *in vivo*, se hace muy compleja. Por otro lado, cabe destacar que la placenta es considerada un órgano con alta diversidad evolutiva entre las distintas especies, por tanto, no existe ningún modelo animal que refleje fielmente el proceso de placentación humana (Schmidt et al, 2015). Los roedores son los animales más empleados en los modelos *in vivo* de esta enfermedad, ya que, a pesar de presentar diferencias significativas con las placentas humanas, exhiben suficientes similitudes anatómicas y estructurales, como ya hemos indicado anteriormente, además de ser de más fácil manejo que otros mamíferos.



Independientemente de las limitaciones en la extrapolación de resultados, una de las principales críticas a los modelos animales de preeclampsia hasta ahora descritos, es que son independientes del estado de gestación. En su mayoría, la placenta no interviene en el desarrollo de los síntomas clínicos, ni se ven reducidos tras el alumbramiento, tal y como sucede en preeclampsia. Como ejemplo de estos modelos tenemos, entre otros, el modelo de administración de L-NAME (N-Nitro-L-Arginina-Metil-Ester), inhibidor de la NOS (Molnar et al, 1994), el de administración de AA-AT1 (LaMarca et al, 2011), o el de arginina vasopresina (Santillan et al, 2014), tras los cuales se observa un aumento de presión arterial, proteinuria y alteraciones renales, independientemente del estado de gestación de estos ratones.

Otro de los inconvenientes encontrados en los modelos animales de preeclampsia, es que la mayoría representan, lo que según Roberts y Hubel han denominado, la segunda etapa de la enfermedad: la respuesta sistémica y los síntomas clínicos maternos (Roberts & Hubel, 2009). Un modelo ideal sería aquel que representa las alteraciones en la placentación (primera etapa) y las alteraciones a nivel sistémico (segunda etapa). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la sintomatología de la preeclampsia es inducida mediante intervención experimental, sin que se tengan en cuenta los procesos de alteración placentaria, que tienen un papel central en esta enfermedad. En este sentido, cabe destacar el modelo de reducción del flujo placentario, RUPP. Este modelo consiste en la reducción del flujo hacia la placenta mediante la oclusión de las arterias uterinas, lo que induce una isquemia placentaria que da lugar a la aparición de la sintomatología, además de a alteraciones a nivel local. Sin embargo, en este modelo, el origen de los daños placentarios no son debidos a modificaciones, ni en la placentación ni en el desarrollo placentario, si no que proviene de una intervención externa en la cual existe una reducción de flujo en las grandes arterias que irrigan la placenta. Esto

afecta al flujo sanguíneo a nivel sistémico, lo que incrementa la presión arterial, por lo que esta manifestación clínica también sería independiente del daño placentario.

Por tanto, la mayor parte de los modelos actualmente utilizados, únicamente nos permiten evaluar las posibles opciones para aliviar la sintomatología materna, sin esclarecer la etiología de la preeclampsia. Sería importante el desarrollo de un nuevo modelo que represente de manera más fisiológica las diferentes fases de esta enfermedad, que en combinación con estudios en modelos *in vivo* y *ex vivo*, nos permita clarificar la fisiopatología de esta enfermedad y obtener un mayor avance en el desarrollo de un tratamiento eficaz.

---

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

*“En un rincón de su cerebro le quedaba suficiente cordura  
para darse cuenta de que estaba parado al borde de un abismo”.*

*la casa de los espíritus, Isabel Allende*



Como ya hemos comentado en el apartado de *Introducción*, de entre los trastornos hipertensivos del embarazo, la preeclampsia es uno de los más graves y frecuentes. Entre el 2% y el 8% de las mujeres gestantes sufren esta enfermedad, siendo la segunda causa de mortalidad materna en el mundo (Ghulmiyyah & Sibai, 2012). En Estados Unidos su incidencia ha aumentado de un 3.4% en 1980 al 8% en 2010 (Henderson et al, 2017). A pesar de su importancia, su etiología y desarrollo aún no son completamente conocidos, aunque ha habido importantes avances en los últimos años en la comprensión de su fisiopatología. Por ello, el principal objetivo que nos planteamos en este trabajo es desenmarañar parte de la etiología de esta compleja enfermedad, con el fin de poder acercarnos un poco más al desarrollo de un mejor tratamiento y diagnóstico de la misma, que nos permita reducir tanto su tasa de mortalidad como su tasa de incidencia.

Recientemente, se ha estudiado el papel de los factores solubles presentes en el plasma de estas mujeres, sFlt1 y sEng, como posibles biomarcadores tanto de diagnóstico como de pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, su mecanismo de liberación y de acción, así como la regulación de los mismos, no han sido aún clarificados. Por ello, con este trabajo intentamos esclarecer el papel que juega sEng en la fisiopatología de la preeclampsia, ya que nuestra principal hipótesis es que sEng no sólo actúa como biomarcador de la enfermedad, si no que participa en la etiología y patogenia de la misma, lo que contribuye, no solo a su sintomatología, sino también a las alteraciones placentarias que dan lugar al desarrollo de la enfermedad.

Para comprobar nuestra hipótesis, estudiamos el papel de sEng en preeclampsia, para lo que nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Obtención de un modelo animal de la enfermedad que presente niveles elevados de sEng en plasma y que represente de forma fisiopatológica lo que ocurre en la preeclampsia.
2. Estudiar el efecto de sEng sobre los principales síntomas clínicos de la preeclampsia:
  - Hipertensión
  - Proteinuria
  - Reducción del crecimiento fetal
3. Estudiar el efecto de sEng sobre las alteraciones placentarias descritas en preeclampsia:
  - Reducción del flujo útero-placentario
  - Hipoxia placentaria
  - Aumento del estrés oxidativo
  - Aumento de la inflamación
  - Liberación de factores solubles como sEng, sFlt1 y PlGF al plasma
4. Analizar el efecto de sEng sobre diversas funciones de las células trofoblásticas en un modelo *in vitro*: línea celular de trofoblastos en cultivo.
5. Analizar el efecto de sEng sobre algunos parámetros funcionales en un modelo *ex vivo*: explantes placentarios humanos.

---

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

*"El modo de dar una vez en el clavo,  
es dar cien veces en la herradura"*

*Miguel de Unamuno*





## Materiales

Todos los reactivos, materiales y aparatos empleados para la realización de este trabajo, así como las casas comerciales, están recogidos en las tablas 8 y 9, que se encuentran al final de este apartado de *Materiales y métodos*.

## Animales de experimentación

### 1. Mantenimiento y manipulación

Los ratones empleados en nuestros experimentos se mantuvieron en régimen de confinamiento controlado en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca bajo barrera libre de patógenos (SPF). Los animales se manipularon siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial y los principios del cuidado y la utilización de los animales de experimentación, estipulados en las regulaciones internacionales y en las siguientes instituciones europeas y nacionales: la Directiva Europea 2010/63/UE, la Ley del Estado Español 32/2007 de cuidado de los animales y los Reales Decretos RD1201/2005 y RD 53/2013 sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y en otros fines científicos.

La dieta empleada para su alimentación es una dieta estándar compuesta por almidón (34,8% del total), proteína bruta (20,2%), cenizas brutas (5,5%), materias

grasas brutas (5%), lisina (1%), calcio (0,9%), fósforo (0,6%), sodio (0,28%), vitamina A (15 UI/g), vitamina D<sub>3</sub> (2,2 UI/g) y vitamina E (70 UI/g). Para su preparación se emplearon los siguientes ingredientes: cereales, subproductos molidos, harinas y tortas oleaginosas, harina de carne, compuestos minerales y corrector vitamínico mineral.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo siguiendo las guías para la eutanasia de los animales de experimentación detallada en el Anexo III del RD 53/2013, basadas en el reglamento 1099/2009 del Consejo Europeo. Además utilizamos como referencia las recomendaciones dictadas por la Asociación de Medicina Veterinaria Americana (AVMA), que se puede consultar en la dirección web detallada en la bibliografía (*American Veterinary Medical Association, 2013*).

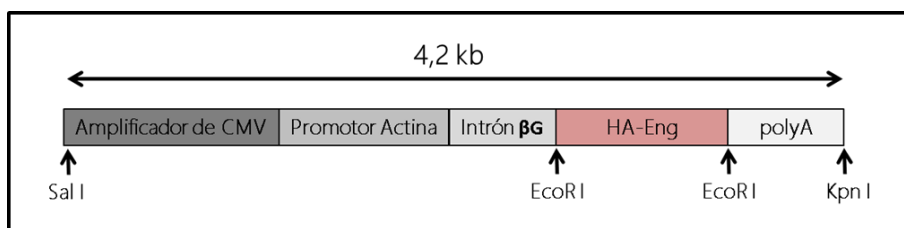
## 2. Ratones transgénicos *sol.eng+*

Para la realización de parte de este trabajo, se emplearon ratones transgénicos de fondo híbrido CBA x C57BL/6J que sobre-expresan el dominio soluble de Eng humana (*sol.eng+*) y ratones *wild type* (WT) del mismo fondo genético, CBA x C57BL/6J. Los ratones empleados tenían 3-5 meses de edad y un peso de 25-35 gramos.

### 2.1. Generación de ratones *sol.eng+*

Estos ratones se generaron mediante la microinyección en un pronúcleo fecundado de un vector portador de ADNc correspondiente a la secuencia de endoglina soluble humana. El vector fue generado en el laboratorio del Dr. Carmelo Bernabéu (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid).

Para la obtención de este vector, se utilizó un constructo formado por la secuencia truncada de endoglina (aminoácidos 26-437) unida al epítipo de la hemaglutinina de *Influenza* (HA). Esta construcción se clona en el sitio EcoRI de un vector pcEXV. Tras la digestión con la enzima de restricción EcoRI, el fragmento se inserta en el sitio EcoRI de un plásmido pCAGGS, bajo el control del promotor de actina de expresión ubicua. Este plásmido es además portador de la secuencia amplificadora del CMV y un intrón del gen de  $\beta$ -globina antes del sitio EcoRI. Después de la secuencia de endoglina soluble, aparece un motivo de poliadenilación del gen de  $\beta$ -globina. Para la obtención de fragmentos lineares para la microinyección, este vector se digiere con las enzimas SalI/KpnI. Mediante electroforesis en un gel de agarosa se obtuvo la separación y purificación del fragmento portador del gen de endoglina de 4,2 kilobases (Kb) (FIGURA 11).



**FIGURA 11:**  
Construcción génica para la generación de los ratones *sol.eng+*

Adaptado de Valbuena-Diez et al, 2012.

Los óvulos fecundados se inyectaron en hembras gestantes en el Servicio de Animales Transgénico de la Universidad de Salamanca, mediante protocolos estándares. Debido a que la microinyección se realiza en un estado inicial del desarrollo, en el óvulo fecundado, el transgen estará presente en todas las células del organismo incluyendo, por tanto, también la línea germinal. De esta forma, los

descendientes de estos ratones son portadores del transgen en todas sus células y éste, gracias al promotor del gen de actina, se expresa de forma ubicua.

## 2.2. Genotipado y fenotipado de ratones *sol.eng+*

El genotipo de los ratones se determinó mediante PCR. Para ello, se digirió una pequeña porción del extremo de la cola de los ratones en un tampón de lisis (Tris 100 nM, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, DTT 1 Mm, y espermidina 0,5 mM) al que se añadió 250ng/μL de proteinasa K (*Roche*), durante 24 horas a 55°C. Tras la digestión, el sobrenadante se almacenó a -20°C. Con 0,5 μL de esta muestra de ADN, se procedió a amplificar por PCR una región específica del plásmido inyectado.

El producto de la PCR se separó en un gel de agarosa 1% (*Lonza*) con un marcador específico de 1 kilobase (*Thermo Fisher Scientific*). Aquellas muestras en las que observamos el producto de PCR correspondería con aquellos animales de la progenie que hubiese incorporado el ADNc correspondiente a la secuencia de endogлина soluble humana, hsEng, en sus células.

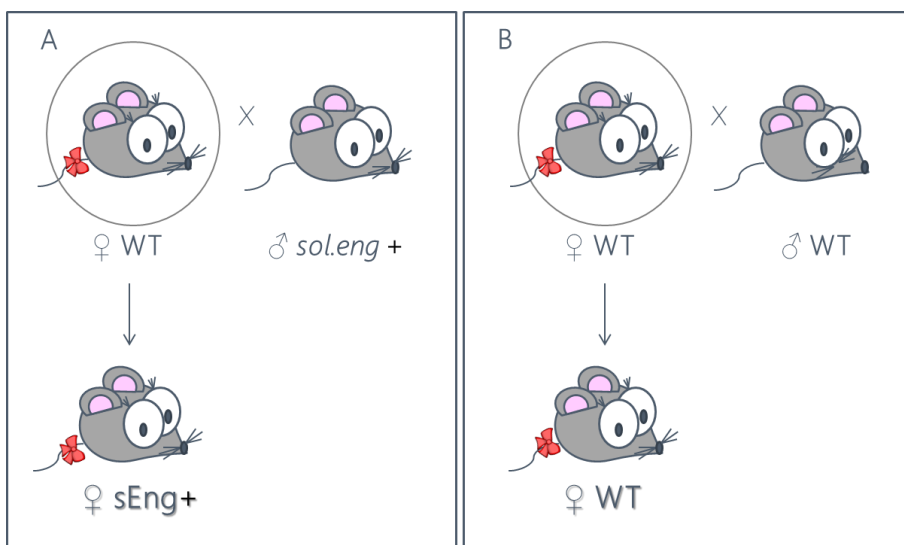
Para asegurarnos de que los ratones empleados para este estudio expresan niveles elevados de sEng, se procedió al fenotipado de aquellos ratones en los cuales se observó el producto de PCR correspondiente al fragmento del plásmido. Este proceso nos permitió determinar los niveles de sEng humana presente en el plasma de estos ratones. Para el fenotipado, extrajimos sangre a partir del seno venoso submandibular, como explicaremos más adelante. Para la determinación de los niveles de Eng humana, empleamos un kit de ELISA comercial *Quantikine Human Endoglin/ CD105* (*R&D System*).

Para la realización de este estudio, se utilizaron aquellos animales que expresaban una concentración de sEng humana en plasma de más de 500 ng/mL.

### 3. Modelo animal de Preeclampsia

#### 3.1. Modelo sEng+

Para la obtención del modelo animal de preeclampsia, al que hemos denominado "Modelo sEng<sup>+</sup>", se cruzaron hembras *wild type* (WT) de fondo genético híbrido CBA x C57BL/6J con machos transgénicos que expresan altas cantidades de sEng humana (*sol.eng*<sup>+</sup>). A las hembras gestantes resultantes de este cruce se las denominó "sEng<sup>+</sup>". Por otro lado, cruzamos hembras WT con macho WT, ambos de fondo genético híbrido CBA x C57BL/6J. Las ratonas gestantes resultantes de este cruce se las llamó "WT" (FIGURA 12).



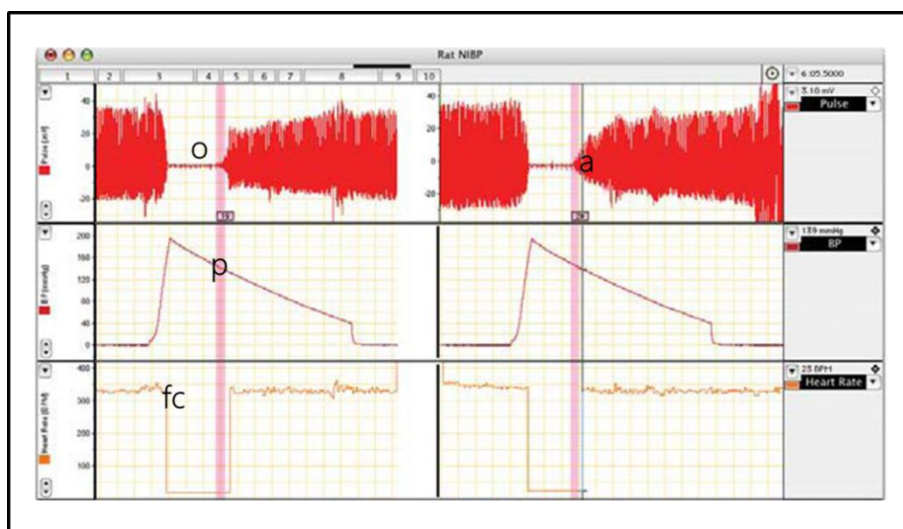
**Figura 12:** Obtención del modelo animal "sEng<sup>+</sup>"

**A.** Cruce de hembras *wild type* (WT) con machos transgénicos *sol.eng*<sup>+</sup>. A las gestantes se les denominó sEng<sup>+</sup>. **B.** Cruce de hembras *wild type* (WT) con machos *wild type* (WT). A las gestantes se les denominó WT.

## Técnicas de experimentación animal

### 1. Medida de presión en cola

El fundamento de la medida consiste en comprimir el tejido alrededor de la arteria caudal mediante un manguito neumático hasta la oclusión completa de la arteria (Pfeffer et al, 1971). Un detector de infrarrojos colocado en la cola transforma la señal mecánica en eléctrica que se monitoriza por medio de un ordenador. Según podemos ver en la figura 13, la desaparición de la señal permite afirmar que se ha producido la oclusión de la arterial (FIGURA 13).



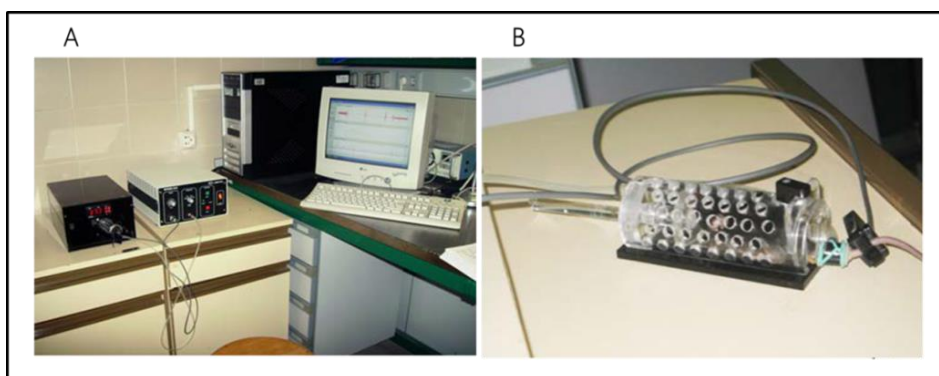
**Figura 13:** Imagen de la pantalla de registro de presión medida en cola

En esta imagen se especifican cada uno de los pasos. **o**: oclusión de la arteria a través del manguito neumático, **a**: aparición de la onda de pulso a medida que disminuye la presión que ejerce el manguito, **p**: la presión neumática en el punto de aparición de la onda de pulso se corresponde con la presión arterial sistólica, **fc**: registro de la onda pulsátil, permite medir simultáneamente la frecuencia cardíaca.

Esta técnica es la técnica más empleada para la monitorización de la presión arterial en ratones despiertos. Tiene las ventajas de ser simple, reproducible, no traumático y, además, permite trabajar con el animal despierto. Sin embargo, para la obtención de buenos resultados es conveniente habituar al animal a este tipo de manipulación, lo que implica un acostumbamiento de los animales durante los días anteriores a la medida definitiva. Una vez que el animal se ha adaptado, la toma de presión se repite un mínimo de tres veces, hasta obtener una medida estable. Se deben tomar al menos 5-7 medidas repetitivas, se descartan las más altas y la más bajas, y obtenemos la media de las medidas restantes.

Los animales se situaron en un cepo de manera que la cola queda libre para poder colocar el manguito y el transductor. Para captar mejor la señal se procedió a la dilatación de la arteria caudal mediante la aplicación de calor durante un periodo de unos cinco minutos. Se utilizó el equipo NIPREM 1.5 que mediante un *software* y un equipo informático adecuado (*Sistema Computerizado PowerLab/800 para Windows, Cibertec S.A*) permite la monitorización y obtención de valores de presión arterial sistólica (PAS) y frecuencia cardíaca (FC) (FIGURA 14).

La toma de medidas se hizo aproximadamente a la misma hora (entre las 9 y las 12 de la mañana), en una habitación aislada de ruidos y a temperatura constante, con el fin de evitar tanto la posibilidad de artefactos debidos al entorno.



**Figura 14:** Equipo NIPREM 1.5

A. Fotografía del equipo NIPREM 1.5 junto con el equipo informático empleado. B. Fotografía del ratón situado en el cepo con el manguito y el transductor en la cola preparado para la toma de presión.

## 2. Extracción de sangre y recogida de plasma

Dependiendo del tipo de experimento a realizar se emplearon diferentes técnicas para la extracción de sangre.

### 2.1. Extracción de sangre del seno venoso submandibular

Esta técnica se empleó para la recogida de plasma a intervalos cortos y volúmenes de hasta 250  $\mu\text{L}$ . Se realizó con el animal despierto. Inmovilizamos al ratón cogiendo un pellizco de piel, lo más amplio posible, de la región dorsocervical y estirando la piel del cuello para practicar éxtasis venoso en la región cefálica durante un corto período de tiempo. Para la extracción, se punzó con una aguja de 18-21G junto al ángulo caudal mandibular y se recogió la sangre con un tubo *ependorf* en el que previamente hemos añadido unas gotas de heparina sódica



5000UI (*Hospira*) para evitar la coagulación. Por último, se aplicó algo de presión con una gasa estéril para cortar la hemorragia y se devolvió al animal a su jaula.

## 2.2. Extracción directa de sangre del corazón

Esta técnica fue utilizada cuando el animal iba a ser sacrificado. Se obtienen volúmenes grandes de hasta 1 mL. Con el animal anestesiado, se colocó decúbito supino y se le realizó una incisión por la línea alba para acceder a la caja torácica y al corazón. Para la extracción de la sangre, se punzó el corazón con una aguja de 25G en dirección cráneo-ventral con un ángulo de 30°, ejerciendo una pequeña presión negativa en la jeringa hasta que fue saliendo la sangre. Se terminó de llenar la jeringa retrayendo el émbolo lentamente. Finalizada la extracción, se procedió a la eutanasia del animal.

Una vez extraída la sangre, por cualquiera de los dos procedimientos explicados, se procedió a la obtención del plasma. La sangre se centrifugó a 7000 g durante 4 minutos a 4°C y, tras su recogida, se almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

## 3. Recogida de orina

Para la recogida de orina, los animales fueron estabulados en jaulas metabólicas. Estas jaulas consisten en un habitáculo de policarbonato transparente y resistente a las mordeduras. Disponen de un comedero fuera de la jaula que contiene un cajón con alimento para facilitar su llenado con papillas, líquidos o polvos, sin molestar al animal, a la vez se evita que la orina se contamine con el alimento. Las jaulas disponen de unos biberones de agua y un tubo para la recolección de los derrames para evitar que caiga dentro de la jaula y contamine la muestra de orina. Las jaulas están diseñadas para la separación de forma efectiva de heces y orina en tubos

externos a la jaula, de forma inmediata y completa, proporcionando muestras puras y fiables (FIGURA 15).



**FIGURA 15:** Jaula metabólica

Fotografía de una jaula metabólica para ratón, empleada en este trabajo para la recogida de orina.

Es importante que los animales sean mantenidos en jaulas metabólicas durante varios días, mínimo 48 horas, para asegurar su acostumbramiento antes de proceder a la recolección de la muestra. Una vez recogida la orina excretada durante 24 horas, fue centrifugada a 2000 g durante 8 minutos para retirar posibles impurezas. Tras anotar el flujo urinario excretado en esas 24 horas, fue almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para nuestro estudio, los animales se estabularon en jaulas, como señalamos anteriormente, hasta el día 10 ó 15 de gestación, según el experimento. En el caso de las medidas tomadas en el 13º día de gestación, los animales se alojaron en jaulas metabólicas desde el día 10 de preñez, y los dejamos 48 horas para su acostumbramiento a las nuevas condiciones. La orina recogida en ese periodo fue descartada. En el 12º día, se puso un colector limpio y durante las siguientes 24 horas se procedió a la recogida de la muestra de orina. En el caso de las medidas

tomadas en el 18º día de gestación, los animales fueron estabulados en jaulas metabólicas en el 15º día, y tras el periodo de acostumbramiento, la orina fue recogida entre el día 17 y 18 de preñez.

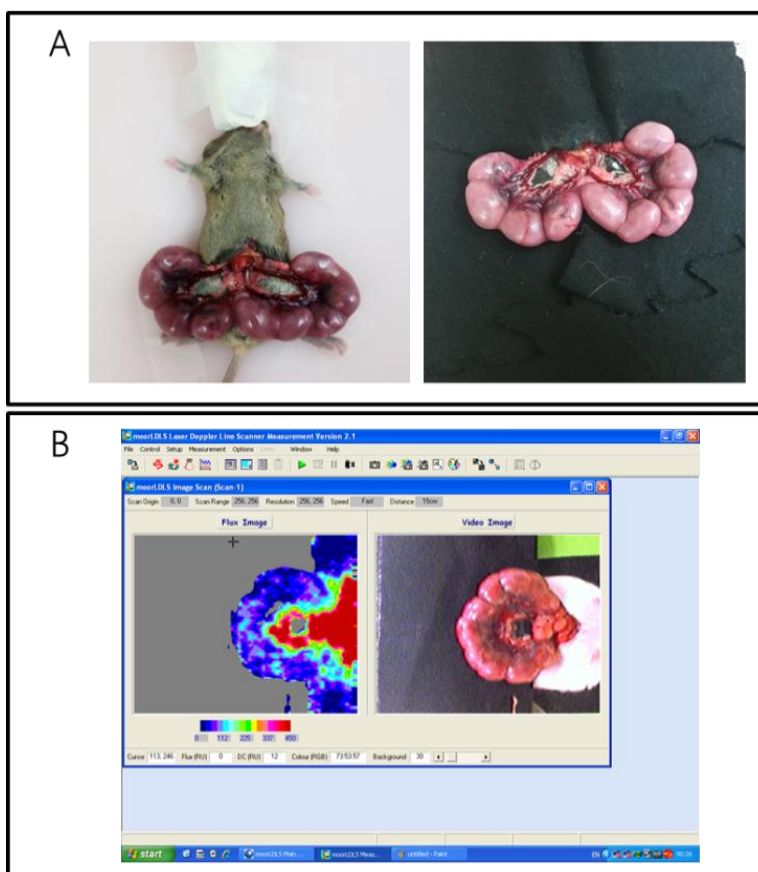
#### 4. Determinación del flujo uterino y fetal mediante láser Doppler

Medimos el flujo sanguíneo uterino y fetal con un equipo *Laser Doppler Moor LDLS*. Esta técnica se basa en el “efecto Doppler”, que consiste en que la luz láser reflejada por la superficie que estamos enfocando, varía en función del desplazamiento de esa superficie.

Nuestro equipo dispone de dos fuentes de luz, una visible de 658 nm de longitud de onda y otra próxima al infrarrojo, de 758 nm. El aparato produce una única línea láser con los haces visibles e infrarrojos coaxiales. Gracias a un espejo colocado por un motor, el láser hace un barrido de la superficie del ratón. Los tejidos serán la superficie que refleje el haz de luz, que será filtrado para eliminar la luz exógena y recibido por un fotorreceptor. Al hacerlo con el animal anestesiado, la sangre es la única superficie en movimiento del animal, por lo que la modificación de la frecuencia de la luz reflejada dependerá directa y exclusivamente del flujo sanguíneo. El *software* acoplado al láser permite, mediante un algoritmo, transformar la frecuencia de la luz recibida por el fotodetector en unidades de flujo arbitrarias, que son representadas en una imagen bidimensional a través de un código de colores. El programa permite cuantificar en esta imagen el promedio de unidades arbitrarias de flujo por cada píxel de un área seleccionada.

Comparamos el flujo, tanto uterino como fetal, de las ratonas gestantes sEng+ y WT, antes de la extracción de las placentas y los fetos. Para ello, los animales se

mantuvieron anestesiados con anestesia inhalatoria: isoflurano 2% en oxígeno (*IsoFlo*, Esteve) decúbito supino, y se procedió a realizar una incisión abdominal de unos 2-3 cm, tanto de la piel como de la capa muscular, para acceder al útero materno. El útero, donde se alojan las placentas con los fetos en desarrollo, se colocó sobre una tela de fondo negro para evitar reflejos lumínicos que interfieran con la señal que llega al fotodetector (FIGURA 16).



**Figura 16:** Adquisición de medidas de imágenes de flujo

A. Ejemplo de una adquisición. B. Imagen del *Software* acoplado al láser y código de colores de unidades de flujo arbitrarias.

Para cada medida, se hicieron sucesivos barridos hasta que se consiguieron resultados constantes y estables. Para una correcta medición, es importante tener en cuenta las diferentes variables. Una de ellas es la distancia entre el lector láser y el animal, que de manera recomendable, debe situarse entre 10 y 20 cm, siendo 15 cm la usada para nuestro experimento. Así mismo, es importante realizar las medidas en una habitación con condiciones de iluminación, temperatura y humedad controladas, ya que variaciones en estos parámetros pueden influir en la lectura.

## 5. Extracción de fetos y placentas.

Tras el tiempo de gestación estimado, se procedió a la extracción de los fetos, placentas y órganos. Para ello, se mantuvo al animal anestesiado mediante anestesia inhalatoria con isoflurano 2% en oxígeno. Una vez realizadas las medidas de flujo uterino y fetal, mediante la técnica de *Laser Doppler* anteriormente explicada, se realizó un pequeño corte en la zona superior del útero, previamente aislado, permitiendo la extracción de los fetos con su placenta correspondiente. Una vez completado el procedimiento, se procedió a la eutanasia del animal.

Se anotó, tanto el peso como el número de fetos y placentas de cada animal, así como el número de fetos no desarrollados o necrosados, que fueron contabilizados como abortos. Posteriormente, se sacrificaron los fetos mediante decapitación, ya que es el método de eutanasia recomendable para ratones neonatos y embriones. Parte de las placentas fueron fijadas en formalina 4% (*Panreac*) para su posterior análisis histológico, mientras otra parte fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análisis bioquímicos.

## Estudios histológicos

Todos los estudios histológicos realizados en este trabajo, así como las imágenes de microscopía obtenidas, se llevaron a cabo en el Servicio de Patología Molecular Comparada y Nodo Coordinador BEOCyL (Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca).

Los tejidos destinados a la realización de los estudios histológicos se fijaron con formalina al 4% durante al menos 24 horas. Después, se deshidrataron en etanol de concentración creciente, desde 50% hasta absoluto, y posteriormente en xileno. Tras la deshidratación, se incluyeron en parafina en una estufa a 60°C durante 24 horas y se obtuvieron bloques, que se cortaron con un micrótomos en secciones transversales de 3  $\mu\text{m}$  de grosor. Por último, los cortes se depositaron en un portaobjetos y se dejaron secar en la estufa durante 1 hora.

### 1. Tinción Hematoxilina-Eosina

Esta tinción permite visualizar al microscopio óptico la estructura morfológica de las células individualizadas, su posición relativa y la forma de los núcleos dentro de las mismas. La tinción hematoxilina-eosina (H&E) corresponde a una mezcla de compuestos colorantes, hematoxilina y eosina. La hematoxilina es un producto natural que se une intensamente a las cargas negativas, como los ácidos, uniéndose, por tanto, al ADN. Este compuesto al ser oxidado da lugar a una sustancia de color morado oscuro denominada hernaiteína, y es por ello que los núcleos de las células presentan esta coloración oscura. La eosina, en cambio, debido a sus cargas negativas hace que se una a compuestos con cargas positivas, es decir, básicos,

como son los componentes y orgánulos citoplasmáticos. La tinción resultante es rosada para el citoplasma y rojo intenso en el caso de los eritrocitos.

Para llevar a cabo esta técnica de tinción, los cortes se desparafinaron en xileno y se hidrataron en concentraciones decrecientes de alcohol (absoluto, 95% y 80%) hasta llegar a agua destilada. A continuación, se sumergieron en la solución de hematoxilina durante 10 minutos. Tras esta tinción, se lavaron los restos de colorante con agua y se sumergió en eosina durante 30 segundos. Por último, se deshidrataron los cortes sumergiéndolos nuevamente en una batería de etanoles de concentración creciente (80%, 95% y absoluto) y xilol. Finalmente, se añadió el medio de montaje DPX y se colocó un cubreobjetos para proteger los cortes. Cuando el medio de montaje estuvo seco, las preparaciones se visualizaron en un microscopio óptico y se tomaron fotografías representativas a diferentes aumentos.

## 2. Tinción PAS (ácido periódico de Schiff)

Esta tinción se emplea para detectar polisacáridos en tejidos, tanto glucógeno como mucopolisacáridos.

El mecanismo de coloración de la tinción de PAS no es como la de los colorantes habituales, sólo por afinidad eléctrica, sino que es una tinción histoquímica, es decir, se realiza inicialmente una modificación química al tejido previa a la coloración. Esta modificación consiste en la oxidación mediante el ácido peryódico de los enlaces entre los carbonos próximos que contienen grupos hidroxilos. Esto provoca la formación de grupos aldehídos que serán reconocidos por el reactivo de Schiff, el cual se combinará con ellos para dar un color morado-rosáceo.

Para llevar a cabo esta técnica se empleó un kit comercial *PAS staining kit* (Merk Millipore). En primer lugar se desparafinaron las muestras en xileno y se hidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol hasta llegar a agua destilada. A continuación se lavó con agua corriente durante 3 minutos y enjuagamos con agua destilada. Los portas se cubrieron en una solución de ácido peryódico durante 5 minutos. Se volvió a lavar con agua corriente durante 3 minutos y a enjuagar con agua destilada. Seguidamente, se cubrieron con el reactivo de Shiff durante 15 minutos. Se repitieron los lavados, 3 minutos con agua corriente y por ultimo con agua destilada. Para aumentar el contraste de la tinción, los cortes se tiñeron con hematoxilina durante 2 minutos. Por último, se lavaron con agua corriente 3 minutos y se deshidrataron las muestras de nuevo pasando los portas por soluciones creciente de etanol (80%, 95% y absoluto). Finalmente, se aclaró con xilol y se procedió al montaje de la misma manera que hemos explicado anteriormente para la tinción de hematoxilina-eosina.

### 3. Inmunohistoquímica

Esta técnica se basa en la localización específica de proteínas en cortes de tejidos. Consiste en la conjugación de un anticuerpo primario con la proteína a identificar y en su posterior detección mediante anticuerpos secundarios ligados a moléculas que permiten la visualización microscópica tras la adición de un cromógeno.

Tras la desparafinación e hidratación del tejido, se llevó a cabo el desenmascaramiento del antígeno hirviendo las muestras en un tampón de citrato a pH 6. El bloqueo se realizó con albúmina bovina sérica BSA al 5% (*Sigma-Aldrich*) en PBS-TWEEN 20 al 0,1% para saturar los posibles sitios de unión inespecífica de los



anticuerpos y se incubó el anticuerpo primario (TABLA 4) en la solución de bloqueo. Después de realizar otro lavado con PBS-TWEEN, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante HRP en la solución de bloqueo y se lavó de nuevo con PBS. Inmediatamente después, se añadió el cromógeno diaminobenzidina (*Sigma Aldrich*), y se lavaron con abundante agua corriente. Seguidamente, se contrastaron ligeramente sumergiéndolos en hematoxilina unos segundos, aclarándolos rápidamente. Por último, se deshidrataron y se montaron las preparaciones. Se almacenaron hasta su observación en el microscopio óptico, donde se evaluó la expresión y localización de las proteínas de estudio y se obtuvieron imágenes representativas a diferentes aumentos.

**TABLA 4:** Anticuerpo empleado en inmunohistoquímica

Gen diana	Referencia	Dilución	Especie hospedadora
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	Abcam #113642	1/750	Rabbit

#### 4. Cuantificación del área ocupada por células de glucógeno (GCs)

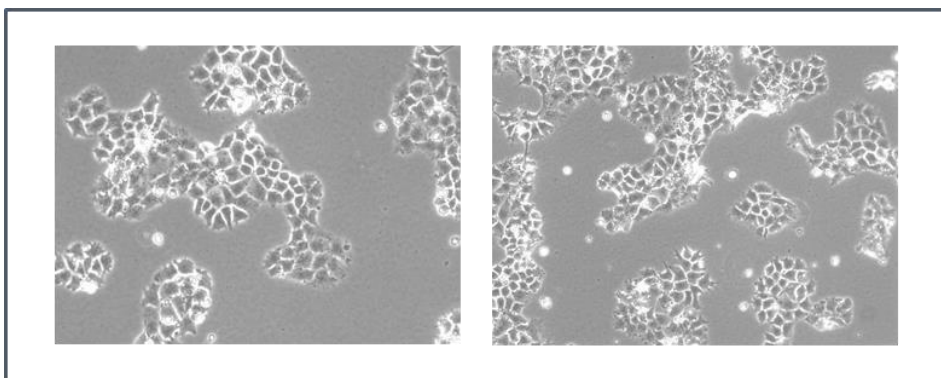
Para la cuantificación del área ocupada por las GCs, se realizaron 4 fotos de cada uno de los cortes teñidos con H&E de cada placenta. Se realizaron con el objetivo de 10X (100 aumentos). Con la ayuda del *software Fiji*, se cuantificó el área ocupada por estas células, y se realizó la media de los valores obtenidos de las 4 fotos de cada placenta. Los datos se representaron como la media del área ocupada por las GCs en cada una de las placentas.

## Cultivos celulares

Todas las manipulaciones con cultivos celulares se realizaron utilizando materiales estériles en campana de flujo laminovertical (*Flow Laboratories*). Las células en cultivo se mantuvieron en un incubador (*Thermo Fisher Scientific*) en atmósfera húmeda, a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%.

### 1. Línea celular de trofoblastos

Para este estudio se empleó una línea celular de coriocarcinoma humano, JAr (Pattillo R.A. et al, 1971) (FIGURA 17). Estas células se mantuvieron con medio de cultivo RPMI-1640 con 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 50 U/mL de penicilina–estreptomicina y enriquecido con suero bovino fetal, FBS, al 10%. El medio de cultivo se cambió cada 48-72 horas. Cuando las células estuvieron confluentes, se hicieron pases en dilución 1:3 o 1:5.



**Figura 17:** Células JAr creciendo en cultivo

Micrografía de células JAr creciendo en cultivo RPMI. Imágenes tomadas con un microscopio óptico de contraste de fases (20 aumentos).

## 2. Técnicas Básicas en cultivos celulares

### 2.1. Tripsinización celular

Al trabajar con células adherentes fue necesario el empleo de esta técnica para levantar las células adheridas a la placa de cultivo.

Después de retirar el medio y lavar con PBS, se añadió tripsina-EDTA (tripsina 0,25%, EDTA 0,02%; *Thermo Fisher Scientific*) para romper los enlaces de cationes bivalentes que unen las células a la superficie de la placa. La acción de la tripsina se detuvo aproximadamente al minuto con medio de cultivo y a continuación las células se transfirieron a un tubo. La suspensión celular se centrifugó a 600 g durante 3 minutos. El precipitado se resuspendió en la cantidad adecuada de medio de cultivo, dependiendo de su posterior utilización.

### 2.2. Recuento celular

Para el recuento del número de células se empleó el contador electrónico *Countess® Automated Cell Counter* (*Thermo Fisher Scientific*). Para ello, se mezcló una muestra de la suspensión celular con azul de trypan, es capaz de penetrar en el interior celular a través de la membrana de las células muertas o dañadas. La membrana de las células vivas se mantiene impermeable a esta sustancia por lo que se observan refringentes sobre el fondo azul de medio y por ello podemos distinguir las vivas de las muertas. Al introducir la muestra en el contador discrimina entre las células vivas y muertas, ofreciendo estos valores en número de células por mililitro.

### 2.3. Congelación y descongelación celular

Para el mantenimiento de las células se llevó a cabo técnicas congelación y descongelación celular.

En el proceso de congelación celular, las células fueron resuspendidas en medio de cultivo con FBS al 50% FBS y DMSO al 10% y almacenada en un vial de crioconservación (*Thermo Fisher Scientific*) que se almacenó dentro de un recipiente relleno de isopropanol, en el que la temperatura va disminuyendo lenta y gradualmente siguiendo un gradiente de 1°C por minuto cuando se introduce en un ultracongelador a -80°C. Después de 24 horas, las células se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido.

En el proceso de descongelación, se introdujeron los viales en un baño de agua a 37°C y una vez descongelados, se transfirió rápidamente el contenido a 10 mL del medio de cultivo. Se centrifugó la suspensión celular a 600 g durante 3 minutos. El precipitado se resuspendió en la cantidad adecuada de medio de cultivo y se sembraron las células en una placa de cultivo.

### 2.4. Tratamientos celulares

Para los distintos experimentos descritos, las células se trataron con diferentes sustancias. Todos los tratamientos se llevaron a cabo en medio de cultivo sin FBS.

Para analizar los efectos de sEng *in vitro*, las células se trataron con endoglina humana recombinante, rhEng (*R&D System*), a concentraciones finales de 100 ng/mL y 200 ng/mL, durante diferentes tiempos, dependiendo del tipo de experimento.

### 3. Ensayos de proliferación celular

#### 3.1. Ensayo de proliferación con Metil tetrazollo (MTT)

El ensayo de MTT es un método colorimétrico de medida de la viabilidad celular basado en la actividad metabólica de las células en cultivo (Mosmann, 1983). La actividad metabólica se determinó incubando las células con una sal de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio). Esta sal, de color amarillo y soluble en agua, es reducida por rotura del anillo de formazán, producto de la succinato deshidrogenasa mitocondrial dando lugar a un producto de color púrpura e insoluble en agua (formazán), cuya absorbancia se midió con un espectofotómetro.

Para la realización de este ensayo, se sembraron  $5 \times 10^3$  células en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Cada una de las condiciones fue sembrada por triplicado. A cada pocillo se añadió 50  $\mu\text{L}$  de 2 mg/mL de MTT. Tras cuatro horas en oscuridad y a 37°C, se añadió 500  $\mu\text{L}$  de una solución solubilizadora (HCl 0,01M, SDS 10%). Las placas se dejaron toda la noche en el incubador y al día siguiente se midió la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 595 nm.

La señal obtenida será mayor cuanto más formazán haya producido, lo que es proporcional al número de células metabólicamente activas. Los datos se analizaron con el *software* acoplado al lector de ELISA, *Gen5 (Bio-Tek)*.

#### 3.2. ELISA de BrdU

En estudios de proliferación celular empleamos el ensayo de inmunoadsorción enzimática, ELISA. Es un método cuantitativo basado en la detección de un antígeno presente en la muestra mediante anticuerpos que, directa o indirectamente,

producen una reacción cuantificable espectrofotométricamente (Engvall & Perlmann, 1971; Voller, 1978). En este caso, se midió la cantidad de BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina) incorporada durante la síntesis del ADN en la proliferación celular (Roche), como aproximación a la tasa de proliferación de las células en cultivo.

Se sembraron  $1,25 \times 10^4$  células por pocillo, por triplicado, en placas de 96 pocillos, y se incubaron con una solución de BrdU durante 2,5 horas. Como controles negativos, se sembraron pocillos de células por triplicado, a las que no se les añadió la solución de BrdU. Una vez transcurrido el tiempo de incorporación de BrdU, se aspiraron los pocillos y se comenzó con el protocolo del ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez finalizado el protocolo, la placa se leyó en un lector a una longitud de onda de 370 nm, utilizando una longitud de onda de referencia de 492 nm.

La señal será tanto mayor cuanto más BrdU se haya incorporado, es decir, cuanto más se hayan dividido las células. Los datos se analizaron con el *software* acoplado al lector de ELISA, *Gen5 (Bio-Tek)*.

## 4. Ensayos de migración e invasión celular

### 4.1. Ensayo de migración a través de transwell

Esta técnica permite medir la capacidad de las células para migrar a través de una membrana con poros de 8  $\mu\text{m}$ .

Las células fueron marcadas con calceína-AM, y tras ser tratadas con las concentraciones determinadas de rhEng, se sembraron  $6 \times 10^4$  células en el compartimento superior del *transwell* en medio de cultivo sin FBS, por triplicado. El compartimento inferior se llenó de medio con FBS al 10%. Se generó así un

gradiente de FBS que facilita el paso de las células del compartimento superior (FBS al 0%) hacia el compartimento inferior (FBS 10%), atraídas por la concentración de factores quimiotácticos presentes en el suero bovino fetal (FIGURA 18.A).

La fluorescencia del compartimento inferior fue medida a diferentes tiempos: 0, 8 y 24 horas. Gracias a la utilización de *transwell* con la membrana porosa opaca, *FluoroBlockTM* (Corning), se pudo determinar la fluorescencia sólo de las células que habían pasado a través de la membrana al compartimento inferior.

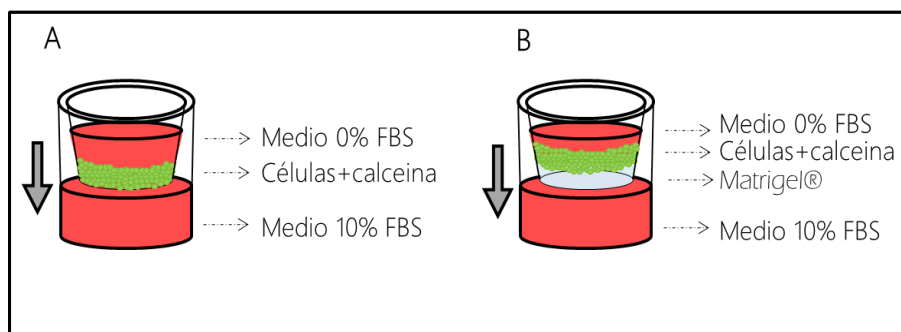
#### 4.2. Ensayo de invasión a través de Matrigel®

Para la realización de estos ensayos de invasión, empleamos *transwell* con *FluoroBlockTM* citados en la técnica anterior. De la manera similar, sembramos  $6 \times 10^4$  células marcadas con calceína-AM y tratadas en medio de cultivo con 0% de FBS. A diferencia del estudio de migración, las células fueron sembradas sobre *transwell* con 50  $\mu$ L de Matrigel® (FIGURA 18.B).

El Matrigel®, o *Matrigel Basement Membrane Matrix Phenol Red-Free*, es un polímero compuesto por proteínas de la membrana basal (laminina, colágeno IV, entactina y heparán sulfato proteoglicano) extraído de tumores Engelbreth-Holm-Swarm. Presenta la característica de que polimeriza adquiriendo una textura de gel a partir de 22°C, pero es líquido a 4°C. Por tanto, siempre se trabajó en frío para mantenerlo líquido, hasta el momento en que queramos inducir su polimerización.

De igual manera, la fluorescencia del compartimento inferior fue medida a diferentes tiempos: 0, 8, 24 y 48 horas. En este caso, las células, atraídas por el gradiente de FBS (0% en el compartimento superior y 10% en el inferior) deben penetrar por el Matrigel® y degradarlo para poder atravesar la membrana del

*transwell*. Por tanto, esta técnica nos permite evaluar la capacidad invasora de las células.



**Figura 18:** Esquema del experimento con *transwell*

A. Esquema del experimento para evaluar la migración celular con *transwell*. B. Esquema de experimento para evaluar la invasión celular con *transwell*.

## 5. Determinación de la muerte celular

### 5.1. Determinación de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) está presente disuelta en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas. Esta enzima se libera al exterior celular como consecuencia de una pérdida de integridad en la membrana celular, como ocurre en el proceso de necrosis.

La cantidad de LDH liberada se cuantificó mediante el kit comercial ScienCell<sup>tm</sup> LDH Citotoxicity Assay (*Innoprot*). Este kit se basa en un método colorimétrico que nos permite medir la actividad de LDH usando un cóctel de reactivos que contiene lactato, NAD<sup>+</sup>, diaforasa y la sal de tetrazolio INT (2-(4-iodofenil)-3-(4-dinitrofenil)-5-feniltetrazolio cloruro). La enzima LDH cataliza la reacción de reducción de NAD<sup>+</sup>



a NADH en presencia de L-lactato. A su vez, el NADH formado es empleado para la reducción de la sal INT a rojo de formazan, cuya coloración mediremos mediante un espectrofotómetro.

Para la realización de esta técnica, se sembraron  $10^4$  células por pocillo, en una placa de 96 pocillos. Cada condición celular es sembrada por triplicado. Sobre estos pocillos añadiremos el cóctel de reactivos a diferentes tiempos de estudio. Como blanco se sembraron pocillos de células a las que añadimos PBS 1X, en lugar de dichos reactivos. Una vez finalizado el proceso, la placa se leyó en un lector a una longitud de onda de 490 nm. La intensidad de coloración obtenida, será mayor cuanto mayor sea la actividad enzimática LDH en el sobrenadante celular, lo cual se correlaciona con la cantidad de células muertas por necrosis.

## 5.2. Determinación de la actividad de Caspasa 3

La caspasa 3 forma parte de la familia de proteínas caspasas (cisteinil-aspartato proteasas). La activación secuencial de estas proteínas juega un papel esencial en el proceso de apoptosis. Después de su activación, la caspasa 3 corta una gran variedad de proteínas celulares, lo que provoca cambios morfológicos y funcionales en las células que llevan a cabo la apoptosis.

Este ensayo nos permite evaluar la actividad enzimática de la caspasa 3. Para ello empleamos el kit comercial *Caspase 3 Assay kit (Innoprot)*. Consiste en un método colorimétrico basado en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilide (pNA), generado después del corte del sustrato marcado acetyl-Asp-glu-Val-Asp p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA) por la caspasa 3. La medida de absorbancia a 405 nm es proporcional a la concentración de pNA, lo cual podemos relacionar con la mayor actividad de caspasa 3.

Sembramos  $3 \times 10^6$  células a las que añadimos el correspondiente tratamiento de sEng durante 48h. Transcurrido ese tiempo, se levantaron y centrifugaron las células. Se resuspendieron con el tampón de lisis con 5 mM del agente reductor DTT (ditiotritol) a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/100  $\mu$ L e incubamos durante 15 minutos en agitación a 4°C. Para el análisis de la actividad de caspasa, pipeteamos en una placa de 96 pocillos 20  $\mu$ L del lisado celular junto con el coctel de reactivos indicados en el kit comercial. Por último, se incubó durante 4 horas a 37°C y se leyó a 405 nm en el lector de placas de ELISA.

## Explantos placentarios

Para el estudio más específico del efecto de sEng en la placenta, se emplearon placentas frescas, recogidas en un tiempo máximo de 30 minutos después del parto, de pacientes sanas, sin ninguna complicación durante el embarazo. Se extirparon varios cotiledones al azar y se lavaron abundantemente con suero salino estéril para eliminar la sangre. Excluyendo la decidua y los grandes vasos, se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 2 cm y se colocaron en una placa de 24 pocillos con 2 ml de medio RPMI 1640 con 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 50 U/mL de penicilina–estreptomicina sin FBS. La mitad de los explantes se trataron con endoglina humana recombinante, rhEng durante 4 y 24 horas. Trascurrido ese tiempo, los explantes se recogieron y se congelaron con nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a -80°C. El sobrenadante también se guardó a -80°C previa centrifugación a 600 g durante 3 minutos.

Este protocolo experimental está en acuerdo con la Declaración de Helsinki (2000) de la Asociación Médica Internacional, así como con los protocolos y guías

de actuación aprobadas por el Comité Ético del Hospital de Salamanca, según la ley de protección de datos española 15/1999 y sus especificaciones de desarrollo y aplicación (RD 1720/2007). Cada paciente incluida en el estudio firmó un consentimiento autorizado para participar en la investigación, después de recibir explicación detallada del mismo. Para garantizar la confidencialidad de los datos, todos los documentos del estudio se guardaron, y solo los investigadores han tenido acceso a los mismos.

## Determinaciones Bioquímicas

### 1. Análisis de la tasa de filtración glomerular

#### 1.1. Determinación de creatinina y aclaramiento de creatinina

Para la determinación de la concentración de creatinina, se empleó el kit comercial *Quantichrom™ Creatinine Assay*, (Biossay System) según las instrucciones del fabricante. Esta técnica consiste en un método colorimétrico basado en la *reacción de Jaffé*. La creatinina reacciona con el ácido pícrico en medio alcalino, formando un complejo de color rojo detectado a una longitud de onda de 510 nm. Los reactivos empleados están optimizados para evitar las interacciones inespecíficas con otras sustancias, como proteínas, acetoacetato, glucosa, ect.

Para la realización de estas medidas, se utilizó una placa de 96 pocillos en la cual pipeteamos 30  $\mu$ L de cada una de las disoluciones que constituyen la recta patrón de creatinina, generada a partir de un estándar de concentración conocida, y 30  $\mu$ L de cada una de las muestras. A continuación, se añadió los reactivos del kit, tras los

cuales comenzó la reacción colorimétrica. Inmediatamente después, medimos la absorbancia a 510 nm en un lector de placas de ELISA (*Bio Tek*). Se dejó incubar la placa dentro del lector en oscuridad durante 5 minutos, realizando medidas cada 5 minutos. Para calcular la concentración de creatinina, extrapolamos en la recta patrón obtenida, los valores de incremento de absorbancia a los 5 minutos, medidos mediante el *software Gen5*.

Los valores de la concentración de creatinina plasmática, la de creatinina en orina y el volumen de orina recogido en 24 horas, permiten calcular el aclaramiento de creatinina, una medida aproximada de la tasa de filtración glomerular, mediante la fórmula siguiente:

$$Cl_{cr} = (FU \times Co) / C_p$$

Donde  $Cl_{cr}$  es el aclaramiento de creatinina (ml/min), FU es el flujo urinario (ml/min), Co es la concentración de creatinina en orina (mg/dl) y  $C_p$  es la concentración de creatinina en plasma (mg/ml).

## 1.2. Determinación de proteínas en orina

La cantidad de proteínas excretadas en la orina diariamente se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Este método consiste en la formación de un complejo de color azul intenso, formado entre el azul de *Comassie* G-250 y las proteínas de la muestra. Este complejo tiene su máximo de absorción a 595 nm. Los datos de absorbancia se extrapolan en una recta patrón realizada mediante diluciones seriadas con albúmina bovina.

Se empleó una placa de 96 pocillos, en donde se pipetearon 4  $\mu$ L de cada estándar de la recta patrón y de cada muestra, y 200  $\mu$ L del reactivo Bradford, todo ello por triplicado. Se midió la absorbancia a los 10-15 minutos a 595 nm en un

lector de placas de ELISA (*Bio Tek*). A partir de las absorbancias obtenidas y extrapolando en la recta patrón, se determinó la concentración de proteínas con el programa *software Gen5*.

La proteinuria está definida como la concentración de proteínas en orina. Dependiendo si la muestra de orina está más o menos diluida, la concentración proteica varia. Por tanto, tradicionalmente, se ha usado el volumen de orina excretado en 24h como factor de corrección de la concentración proteica urinaria. Dada la dificultad de la recogida de la muestra durante 24h, se utiliza el cociente proteína/creatinina como medida de evaluación de la proteinuria (Jaschevatzky et al, 1990; Villafruela et al, 1990). Debido a que la creatinina se produce y elimina a una tasa relativamente constante, la cantidad de creatinina en orina puede compararse con la cantidad de las otras sustancias que se miden y por tanto, emplearse también como factor de corrección.

En este trabajo, para la medición de este parámetro hemos aplicado la siguiente fórmula:

$$[\text{Proteínas en orina}] / [\text{Creatinina en orina}]$$

## 2. Determinación de la concentración de proteínas en tejido y células

Para la determinación de la concentración proteica de los extractos tisulares y celulares, se siguió el protocolo del kit comercial colorimétrico *DC<sup>TM</sup> Protein Assay* (*Bio-Rad*), basado en el método de Lowry (Lowry et al, 1951). Se emplearon placas de 96 pocillos, dónde se pipeteó 5 µL de cada una de las muestras procedentes de los extractos proteicos, así como de cada uno de los puntos de una recta patrón, previamente preparada mediante diluciones seriadas a partir de una muestra de

concentración conocida. A continuación se añadieron los reactivos del kit produciéndose la reacción colorimétrica. Se midió la absorbancia de los productos de reacción a 720 nm en un lector de placas de ELISA (*Bio Tek*). Los valores de absorbancia de las muestras se extrapolaron en la recta de absorbancia obtenida mediante diluciones seriadas de albumina, empleando el *software Gen5*.

### 3. Medida de estrés oxidativo

Como medida de estrés oxidativo, se evaluó la peroxidación lipídica, que es un mecanismo bien definido de daño celular, tanto en animales como en plantas, por una alteración oxidativa de los lípidos de membrana, mediado por especies reactivas de oxígeno.

#### 3.1. Determinación MDA

La peroxidación lipídica se evaluó midiendo los niveles de productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA), como el malonil dialdehído (MDA).

Los productos de peroxidación lipídica puede reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, y tienen efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos. La técnica utilizada está basada en el método colorimétrico de Recknagel y Glende, en la que se detectan los productos de degradación de los lípidos (aldehídos). Se basa en que dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) reaccionan con una molécula de aldehído para generar un cromóforo que absorbe a 523-535 nm (Recknagel & Glende, 1984).

El tejido placentario se homogenizó en una solución formada por fosfato 20  $\mu\text{M}$  y NaCl 50  $\mu\text{M}$ , a un pH de 7.4, a la que se le añadió peróxido de hidrogeno en una

proporción 1:5. La concentración molar de aldehidos la conoceremos gracias a la extrapolación en una recta patrón previamente preparada mediante diluciones seriadas, a partir de una solución de MDA 20  $\mu\text{M}$ .

Tanto las muestras como los estándares de la recta, se incubaron en presencia de TBA al 20% y TCA (tricloroacético) al 67% durante 20 minutos a 80°C. Posteriormente, centrifugamos a 9000 g durante 5 minutos. Recogemos el sobrenadante y pipeteamos 50  $\mu\text{L}$ , tanto de las muestras como de los estándares, en una placa de 96 pocillos para la lectura en un lector de placas de ELISA (*Bio Tek*).

#### 4. Determinación de la actividad de metaloproteinasas

Para determinar la actividad de las metaloproteinasas (MMPs) se empleó el sustrato peptídico fluorescente Mca-PLG-Dpa-AR-NH<sub>2</sub> (*R&D System*). Este péptido es un buen sustrato para muchas MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, etc.). El péptido contiene un residuo de 7-metilcumarina altamente fluorescente, que se encuentra unido a un residuo de 2,4-dinitrofenilo que "secuestra" su fluorescencia. Las metaloproteinasas reconocen el sustrato y son capaces de romper la unión entre ambos residuos, liberando el residuo fluorescente. Por lo tanto, la fluorescencia es proporcional a la actividad de las metaloproteinasas.

Para llevar a cabo este experimento, se preparó una cobertura de Matrigel® en el fondo de los pocillos de una placa de 96 pocillos. Gracias a esta cobertura, las células activan las enzimas metaloproteinasas, encargadas de degradar la matriz extracelular en el proceso de invasión. Sembramos  $2 \times 10^4$  células en medio 0% FBS con diferentes concentraciones de sEng. Además, se añadió a cada pocillo, el

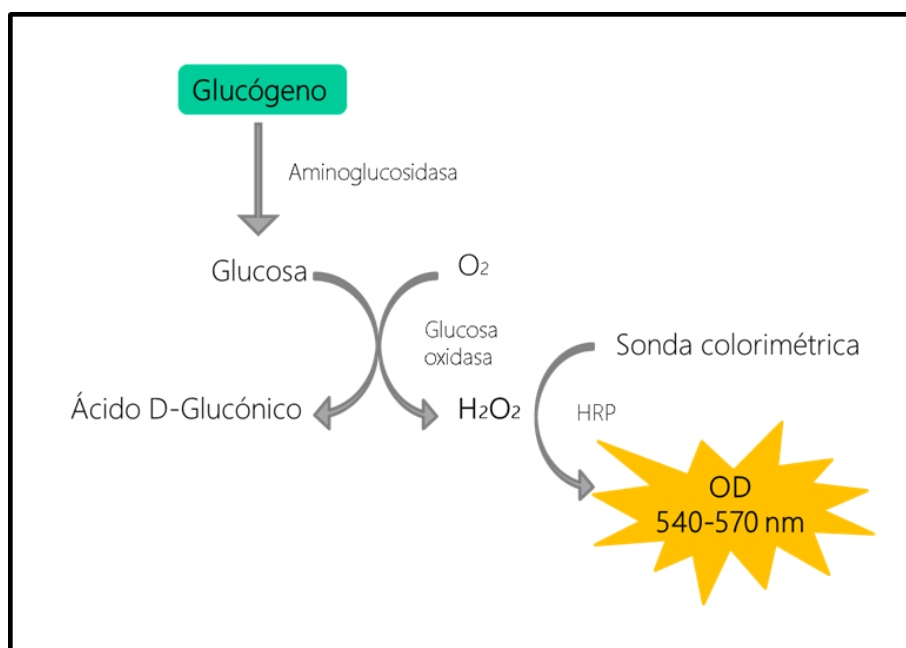
sustrato peptídico a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Una vez sembradas las células sobre el Matrigel®, las metaloproteinasas comienzan a actuar rompiendo la unión entre los residuos 7-metilcumarina y 2,4-dinitrofenilo. Se midió la fluorescencia a diferentes tiempos: 0, 8 y 24 horas.

## 5. Determinación de la concentración de glucógeno.

Para determinar la cantidad de glucógeno, se empleó el kit comercial *Glycogen Assay Kit colorimetric* (Cell biolabs, INC). El glucógeno es un polisacárido formado por monómeros de glucosa y está considerado como una de las principales reservas energéticas. El glucógeno es fragmentado en monómero por la acción de la enzima aminoglucosidasa. La glucosa liberada es oxidada por la acción de la glucosa oxidasa en ácido D-Glucónico, liberando  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El peróxido resultante es detectado mediante su reacción con una sonda colorimétrica, catalizada por la enzima peroxidasa de rábano picante. La absorbancia obtenida a 540-570 nm será proporcional a la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que a su vez, es proporcional a la concentración de monómeros de glucosa procedente de la degradación del glucógeno (FIGURA 19).

Para llevar a cabo este proceso, homogenizamos muestras de placentas en PBS y centrifugamos a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recogido para la posterior medida de la concentración de glucógeno siguiendo las instrucciones del fabricante.





**Figura 19:** Determinación de la concentración de glucógeno

Reacciones llevadas a cabo para la determinación de la concentración de glucógeno por el *kit Glycogen Assay*.

## Técnica de ELISA

Muchas de las moléculas importantes para este trabajo fueron determinadas mediante el empleo de la técnica de ELISA. Para ello, se emplearon los kits comerciales especificados a continuación siguiendo las instrucciones del fabricante (TABLA 5).

TABLA 5: ELISAs empleados para determinar proteínas en plasma

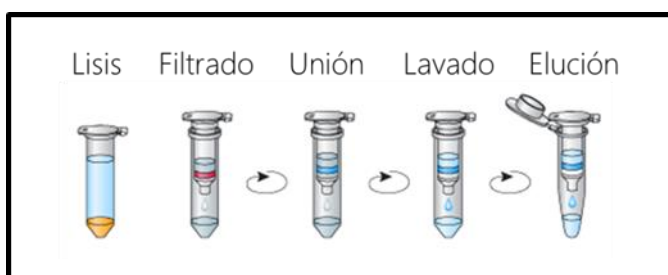
Gen diana	Referencia	Nombre y casa comercial	Especie
hEng	DNG00	kit Quantikine Human Endoglin/CD105 Immunoassay R&D Systems	Humano
mEng	MNDG00	kit Quantikine Mouse Endoglin/CD105 Immunoassay R&D Systems	Ratón
FLT1	KA1819	Flt1 (Mouse) ELISA kit Abnova,	Ratón
PLGF	ab197748	Mouse PLGF ELISA Kit Abcam	Ratón
BMP4	LS-F13543	Mouse BMP4 ELISA Kit LifeSpan BioSciences	Ratón
BMP4	LS-F10950	Human BMP4 ELISA Kit LifeSpan BioSciences	Humano

## Análisis de la expresión génica

### 1. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN de las células en cultivo, se sembraron las células en placas de 60 mm con medio al 0% de suero, y se dejó que alcanzaran un estado de subconfluencia (aproximadamente del 80%). Cuando estuvieron listas se trató a la mitad de las placas con rhEng, a una concentración de 100 ng/mL. A la mitad restante, las que empleamos como controles, únicamente se las cambio el medio. Después de 24 horas, se procedió a la extracción mediante el empleo del kit comercial NucleoSpin®RNA II (*Macherey-Nagel*). Una vez lisadas las células, se

pasaron por una columna de filtrado para limpiar la muestra y posteriormente, el eluido filtrado se pasó a una columna con una membrana que retiene ácidos nucleicos. Tras ajustar las condiciones para la unión de los ácidos nucleicos a la membrana, ésta se incubó con ADNasa recombinante, que digiere el ADN. Por ultimo, se eluyó el ARN en H<sub>2</sub>O DEPC, después de realizar una serie de lavados (FIGURA 20). El RNA obtenido se cuantificó con un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)* y se almacenó a -80°C.



**Figura 20:** Pasos para la extracción de ARN con el kit NucleoSpin® RNA II

Esquema del protocolo de extracción de ARN empleado

## 2. Obtención de ADNc

Para el análisis de la expresión génica necesitamos emplear ADN como sustrato de la reacción. Gracias al empleo de transcriptasas reversas virales, que sintetizan ADN copia a partir de RNA (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970), podremos obtener ADNc a partir del ARNm purificado de las muestras (Kacian & Myers, 1976).

Con el fin de sintetizar ADNc, se diluyeron 500 ng de ARN de cada muestra con H<sub>2</sub>O con DEPC, hasta un volumen total de 16 µL. A continuación, se añadió 4 µL de la *iScript RT Supermix 5X (Bio-Rad)*, que contiene transcriptasa reversa, dNTP, oligo (dT), random primers, inhibidor de ARNsas, estabilizadores de MgCl<sub>2</sub> y el tampón de

reacción. Los 20  $\mu\text{L}$  se incubaron en un termociclador *MyCycler<sup>TM</sup>* (Bio-Rad) a 25°C durante 5 minutos a 42°C y 5 minutos finales a 85°C. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C.

### 3. Técnica de PCR cuantitativa (qPCR)

Esta técnica consiste en la amplificación de regiones específicas de ADN, gracias a la ayuda de cebadores específicos que anillan a ambos flancos de esa región, y a la acción de ADN polimerasa que sintetiza ADN nuevo mediante la copia de la secuencia de dicha región gracias a la elongación de los cebadores (Bessman et al, 1958). Esta copia se lleva a cabo durante sucesivos ciclos, que llevará a la amplificación exponencial de ADN en cuestión (Mullis et al, 1986).

La qPCR se preparó sobre un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  en el que se incluye 1  $\mu\text{L}$  de ADNc, 10  $\mu\text{L}$  de la *Supermix IQ<sup>TM</sup> SYBR® Green* (Bio-Rad), 0,4  $\mu\text{L}$  de cada cebador y 8,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  mQ. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *IQ<sup>TM</sup> 5* (Bio-Rad) donde se incubó la reacción durante 5 minutos a 95°C, donde se produjo una primera desnaturalización del ADNc, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de anillamiento específica de cada cebador, y 30 segundos a 60°C. La cámara acoplada al termociclador toma una imagen de la muestra la final de cada ciclo, detectando la señal fluorescente, mayor cuanto más producto de PCR, al haber más ADN de doble cadena. Una vez terminado este proceso, la temperatura del termociclador aumenta desde 70°C hasta 95°C, de forma gradual, con un aumento de 0,5°C en cada ciclo de 10 segundos y tomando fotografías al final de cada uno. Con esto se produce la desnaturalización de ADN, obteniendo una curva *melting* o de disociación de nuestro producto de PCR, que

debe ser única para confirmar que se trata de un producto único y descartar la formación de productos secundarios por uniones inespecíficas.

El *software* acoplado al termociclador establece una línea umbral que corta a las curvas de amplificación de cada muestra cuando todas ellas están en fase exponencial (línea de *threshold*). Después calcula los niveles de expresión relativos de las diferentes muestras. Estos niveles dependen del ciclo de amplificación de cada muestra en la que la curva de amplificación en fase exponencial corta la línea de *threshold*. A este ciclo se le conoce como Ct. Un Ct más bajo indica una mayor cantidad de ADN del gen en estudio, ya que alcanzará antes la fase exponencial, en un ciclo más bajo.

Se utilizó como *housekeeping*, o gen constitutivo (genes que se expresan de manera constitutiva y de forma relativamente constante en todos los tejidos) la expresión del gen de  $\beta$ -actina de ratón y GAPDH para las muestras humanas.

En las tablas 6 y 7 se especifican los cebadores empleados en este trabajo (TABLA 6 y 7).

TABLA 6: Cebadores de diseño propio para qPCR

Gen diana	Secuencia de los cebadores (5' → 3')	T <sup>a</sup> de anillamiento	Especie
<i>B-Actina</i>	TCTACAAATGTGGCTGAGGACT GAGGGACTTCCTGTAACCACTT	59	Ratón
<i>CD31</i>	TGCCGTGGAAAGCAGATAC GGAGCAGGGCAGGTTTCATAA	53	Humano
<i>ENG</i>	AGGTGCTTCTGGTCCTCAGT CCACTCAAGGATCTGGGTCT	65	Humano
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	GCCTGTGTTTTCTCCTTGC TGCTGCCTAATGTCCCCTTG	59	Humano
<i>IL-6</i>	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC AGTCTCCTCTCCGGACTTGT	59	Ratón
<i>Ecad</i>	CAAGCTATCCTTGCACCTCAG GCATCAGAGAACTCCTATCTT	59	Humano
<i>GAPDH</i>	CAATGACCCCTTCATTGACC GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	59	Humano
<i>VEcad</i>	TGGTCACCCATGCATCTTCC CCATGACGAAGGGTGAGCTT	53	Humano

TABLA 7: Cebador comercial para qPCR

Gen diana	Referencia	Especie
<i>BMP4</i>	QMmuCID0006851	Ratón

#### 4. Diseño de cebadores para qPCR

Para el análisis de la expresión de algunos de los genes de interés, se diseñaron secuencias de cebadores y se comprobó su eficacia en la amplificación de una sola secuencia génica específica.

Para el diseño de cebadores, se utilizó la base de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA). Mediante su herramienta Primer-BLAST, se seleccionó la pareja de cebadores que se consideró que mejor reunía los requisitos, según los datos aportados por el programa: longitud del amplicón en torno a 100 pares de bases, porcentaje de pares GC en torno al 50%, y grado de autocomplementariedad bajo.

Para comprobar el funcionamiento de la pareja de cebadores en cada caso, se llevaron a cabo dos pruebas. En primer lugar, un gradiente de temperaturas consistente en una qPCR que utiliza diferentes temperaturas de anillamiento. Esto nos permitió, por una parte, elegir la temperatura de anillamiento a la que mejor funcionas en nuestros cebadores, es decir, la que ofreciese un Ct más bajo. Por otro lado, el análisis de la curva de *melting* del producto de PCR, nos permitió saber si se había amplificado un solo producto o había habido amplificaciones inespecíficas que invalidasen el uso de estos cebadores. Cabría la posibilidad de que dos productos de PCR de diferente longitud tuviesen una curva de melting similar por su composición en pares de bases, por lo que llevamos a cabo una electroforesis en gel de agarosa de los productos de qPCR obtenido en la anterior prueba. Esto nos permitió comprobar que nuestra pareja de cebadores sólo ofrecía un producto de PCR.

Posteriormente, comprobamos la eficiencia de amplificación de nuestra pareja de cebadores, amplificando diluciones seriadas 1:3 de una muestra, y comprobando que el producto de PCR obtenido en cada muestra conservaba la proporción con respecto a la muestra sin diluir. Así, se elaboró una recta que enfrentaba el Ct con la dilución de la muestra. Se dieron por válidas rectas con un valor de R2 superior a

0,99. Además, la eficiencia, es decir, la proporción de ADN que rendía la reacción de PCR en cada muestra, o pendiente de la recta, debía estar entre el 90 y el 110%.

Un resultado positivo en ambas pruebas validaba nuestros cebadores para su uso. En la tabla 6 están especificados los primers de diseño proio usados en este trabajo.

## Tratamiento de datos y análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). En primer lugar, se detectaron y eliminaron los valores atípicos, *outliers*. Consideramos *outliers* aquellos datos que se encontraron por encima o por debajo de los valores obtenidos tras la aplicación de la siguiente fórmula: Media $\pm$ (1,5 x EEM).

Una vez eliminados los *outliers*, se aplicó el test D'Agostino-Pearson a los conjuntos de datos para comprobar si su distribución se ajustaba a normalidad. En caso afirmativo, se aplicaron test estadísticos paramétricos, y se utilizaron test no paramétricos para analizar conjuntos de datos que no presentaban una distribución normal. El test D'Agostino-Pearson no se puede aplicar para conjuntos con menos de 8 datos, por lo que en estos casos se aplicó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

Para datos normales, se utilizó el test estadístico t de student para determinar si hay diferencias significativas entre dos grupos de datos y el análisis de la varianza



(ANOVA) cuando comparamos más de dos grupos de datos. Consideramos significativo un valor de  $p < 0,05$ . En caso de encontrar diferencias significativas en el estudio del ANOVA, empleamos el test de Dunnett para las comparaciones “post hoc”. Si los datos no se ajustan a la normalidad, empleamos el test t de student para datos no paramétricos.

En el análisis de los datos de qPCR, se aplicó una transformación logarítmica del valor de expresión relativa obtenido. Esto permitió transformar la distribución de los datos, con sesgo positivo, en una distribución normal. Una vez transformado el conjunto de datos, se puede conocer si hay *outliers* en la muestra y eliminarlos. Sobre el valor transformado aplicamos los test estadísticos mencionados.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con Microsoft Excel 2016 y GraphPad Prism 6.

TABLA 8: Relación de reactivos y productos utilizados

Reactivo	Producto Referencia	Casa comercial
ADN polimerasa	10.003	Biotoools
ADNasa	D5025	Sigma-Aldrich
Agarosa	50000	Lonza
Agujas 19 gauges	4657799	Braun
Agujas 23 gauges	4657667	Braun
Agujas 25 gauges	9186158	Braun
APS (Persulfato de amonio)	A3678	Sigma-Aldrich
Azul de bromofeno	B8026	Sigma-Aldrich
Azul de <i>Comassie</i>	G-250	Fluka
Azul de trypan	T10282	Thermo Fisher Scientific
BSA (albúmina sérica bovina)	A7906	Sigma-Aldrich
Buprex (buprenorfina)	-	RB Pharmaceuticals
Calceína-AM	17783	Sigma-Aldrich
Caspase 3 Assay kit	P40120	Innoprot
Cebadores caseros PCR	-	Isogen Life Science
Quantichrom™ Creatinine Assay	DICT-500	Biossay System
Crioviales	5000-0020	Thermo Fisher Scientific
DC™ Protein Assay (Lowry)	5000112	Bio-Rad
Diaminobenzidina	91-95-2	Sigma Aldrich
DMSO (dimetil sulfóxido)	154938	Sigma-Aldrich
EDTA (etilendiaminotetracético)	E5134	Sigma-Aldrich
ELISA BrdU	11 647 229	Roche
Espermidina	S0266	Sigma-Aldrich
Etanol	100983	Merck
FBS (Suero bovino fetal)	10270	Thermo Fisher Scientific
Formol 10%	252931.1214	PanReac
Glutamina	G8540	Sigma-Aldrich
Glycogen Assay Kit colorimetric	MET-5022	Cell Biolabs, INC
HCl	H/1200/PB15	Thermo Fisher Scientific
Heparina sódica 5000 UI	654754.0	Hospira

Inhibidores de fosfatasa <i>PhosSTOP</i>	04 906 837	Roche
Inhibidores de proteasas <i>Complete</i>	11 697 498	Roche
iScript RT Supermix 5X	170-8841	Bio-Rad
Isoflurano <i>IsoFlo</i>	34009XN	Esteve
Jeringas 20 mL	35308691	Braun
Jeringuillas 1 mL	9161406V	Braun
Marcador 1 kb	10787-018	Thermo Fisher Scientific
Material quirúrgico	-	Fine Science Tools (F.S.T.)
Matrigel®	356237	Corning
MTT (metil tetrazolio)	M5655	Sigma-Aldrich
NaCl	S3014	Sigma-Aldrich
NucleoSpin® RNA II	740.955	Macherey Nagel
PAS staining kit	101646	Merk Millipore
Penicilina – Estreptomicina	15140-122	Thermo Fisher Scientific
Pipetas de plástico de 5, 10 y 25 mL	P6148	Corning
p-iodofenol	I10201	Sigma-Aldrich
Placas de cultivo	-	Corning
Portaobjetos	76x26	Thermo Fisher Scientific
Proteinasa K	03115879001	Roche
Puntas micropipeta con filtro	-	Neptune
Puntas micropipeta sin filtro	2000/80 /16	Deltalab
Rascadores de células	353086	Corning
rhEng (recombinante human endoglin)	1097-EN	R&D Systems
RPMI 1640	11875093	Thermo Fisher Scientific
ScienCell™ LDH Citotoxicity Assay	P40104	Innoprot
SDS (Dodecil sulfato sódico)	152002C	Bio-Rad
Supermix IQ™ SYBR® Green	170-8882	Bio-Rad
Sustrato peptídico fluorescente Mca-PLG-Dpa-AR-NH <sub>2</sub>	ES001	R&D Systems
RedSafe	21141	Intron Biotechnology
TBA (Ácido Tiobarbitúrico)	T5500	Sigma-Aldrich
TCA (Ácido Tricloroacético)	1410671	PanReac
TEMED (tetrametil-etilendiamina)	142093	PanReac

Tripsina 0,25% - EDTA 0,02%	25200	Thermo Fisher Scientific
Tris base	443866G	Merck
Triton-X100	X100	Sigma-Aldrich
Tubos de plástico de 1,5 mL	175508	Nirco
Tubos de plástico de 15 y 50 mL	-	Corning
Tubos de plástico de 2 mL	4092.7N	Deltalab
Tween-20	P7949	Sigma-Aldrich
$\beta$ -mercaptoetanol	M6250	Sigma-Aldrich

**TABLA 9:** Relación de equipos/ aparatos utilizados

Reactivo	Casa comercial
Campana de flujo laminar vertical Gelaire TC-48	Flow Laboratories
Centrífugas	Eppendorf
Countess® Automated Cell Counter	Thermo Fisher Scientific
Equipo de medida de presión en cola NIPREM 1.5	Panama
Equipo electroforesis PCR	Bio-Rad
Fuente de alimentación Power Pac 3000	Bio-Rad
Imán para tubos de 15 mL	Thermo Fisher Scientific
Incubador	P.Selecta
Incubador de células Forma Scientific 3111	Thermo Fisher Scientific
Lavador de placas de ELISA (ELX50)	Biotek instrument, INC
Lector de placas ELISA Elx800	BioTek
Lector de placas ELISA Epoch	BioTek
Lector de placas FluoroSkan Ascent	Thermo Fisher Scientific
Máquina anestesia inhalatoria	MSS Isoflurane
Microscopio de contraste de fases 2 ELW 0.3	Nikon
Nanodrop (ND-1000)	Thermo Fisher Scientific

Termociclador iQ™ 5	Bio-Rad
Transiluminador GelDoc	Bio-Rad
Termociclador MyCycler™	Bio-Rad
Ultracongelador	Thermo Fisher Scientific



---

# RESULTADOS

---

*"El mundo exige resultados.  
No les cuentes a otros tus dolores del parto, muéstrales al niño. "*

*Indira Gandhi*





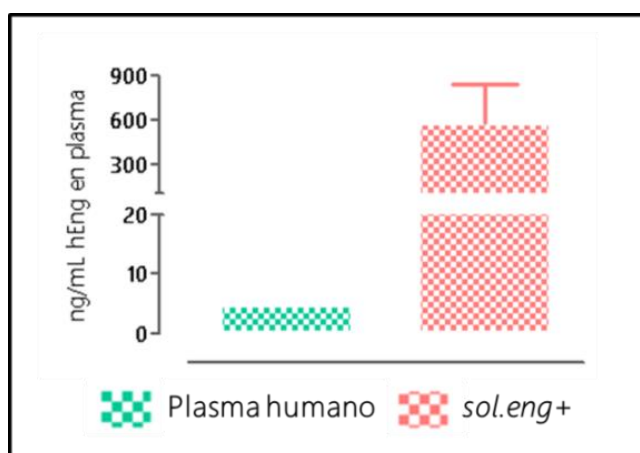
## Modelo de preeclampsia “*sol.eng+*”

### 1. Caracterización del modelo

Para el estudio del papel de sEng sobre los principales síntomas clínicos de preeclampsia, empleamos ratones transgénicos de fondo genético híbrido CBA x C57BL/6J que sobre-expresan la proteína endoglina soluble humana (hsEng) en plasma.

#### 1.1. Concentración plasmática de hEng

Para asegurarnos que estos ratones presentan niveles elevados de hsEng, medimos la concentración de la misma en plasma mediante el empleo de un kit de ELISA.



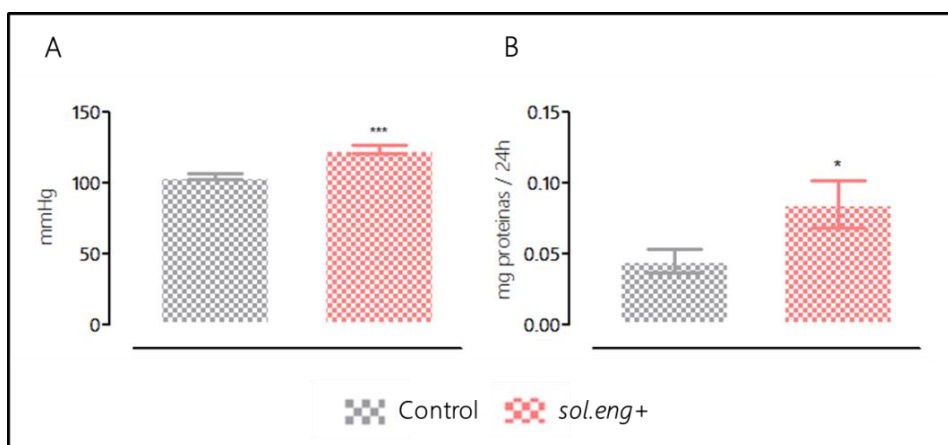
**FIGURA 21:** Concentración de endoglina humana en plasma

Concentración de hEng en plasma de ratones *sol.eng+* y plasma humano.

Los niveles plasmáticos de sEng en estos ratones son variables. Los animales empleados para este trabajo expresaron entre 600 y 2000 ng/mL de hEng en plasma. Observamos que en los ratones *sol.eng+* la expresión de hsEng es aproximadamente 100 veces superior que la de una persona normal (FIGURA 21).

### 1.2. Síntomas clínicos de preeclampsia en *sol.eng+*

Estudiamos si estos ratones transgénicos presentan síntomas de preeclampsia. En primer lugar, medimos la presión arterial sistólica de los ratones *sol.eng+* comparándola con la de sus hermanos de camada que no han incorporado el gen truncado, y que los utilizamos como controles. Estos resultados muestran que los ratones con altas concentraciones de hEng en plasma tienen una presión sistólica mayor que los controles (FIGURA 22.A).

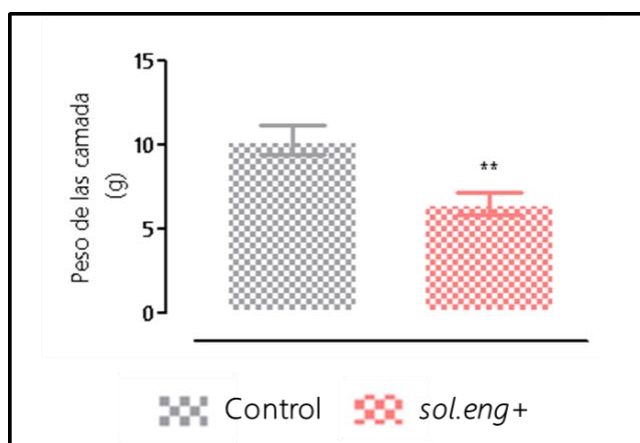


**FIGURA 22:** Presión arterial y proteinuria de ratones Control y *sol.eng+*

A. Medida de presión sistólica en ratones controles y *sol.eng+*. Controles (n=8), *sol.eng+* (n=10). B. Medida de proteinuria en ratones controles y *sol.eng+*. Controles (n=9), *sol.eng+* (n=8). Análisis estadístico t de student para datos paramétricos: \*\*\*p<0,0001 vs Control; \*p<0,05 vs Control. Cada barra representa la media ± EEM.

En cuanto a la proteinuria, observamos una mayor excreción de proteínas en la orina en los ratones *sol.eng+* con respecto a los controles (FIGURA 22.B).

Además, el peso del conjunto de todos los fetos de las camadas al final de la gestación (día 18) en las ratonas transgénicas *sol.eng+* gestantes, es menor que en las WT (FIGURA 23).



**FIGURA 23:** Peso de las camadas de gestantes Control y *sol.eng+*

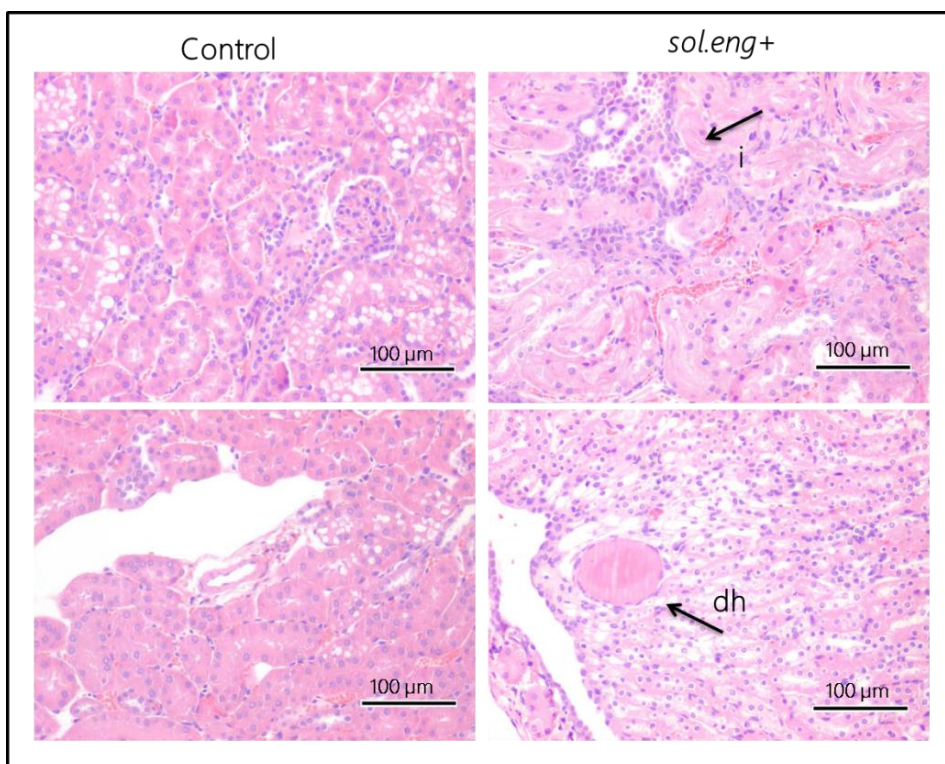
Peso de las camadas de gestantes control y *sol.eng+* a día 18 de gestación. Control (n=11), *sol.eng+* (n=14). Análisis estadístico t de student para datos paramétricos: \*\*p<0,01 vs Control. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

A la vista de estos resultados, podemos confirmar que este modelo animal (*sol.eng+*), con altas concentraciones de hEng humana en plasma, reproduce los principales síntomas de preeclampsia: hipertensión, proteinuria y reducción del crecimiento fetal. En consecuencia, podemos hipotetizar que sEng favorece, al menos en parte, la aparición de los síntomas clínicos de la preeclampsia.

### 1.3. Alteraciones renales en *sol.eng+*

El aumento de proteinuria en preeclampsia se ha asociado a la presencia de daños renales, tales como alteraciones en las células endoteliales, depósitos de

fibrinógeno, pérdida del endotelio fenestrado y de podocitos glomerulares (Krane & Hamrahian, 2007).



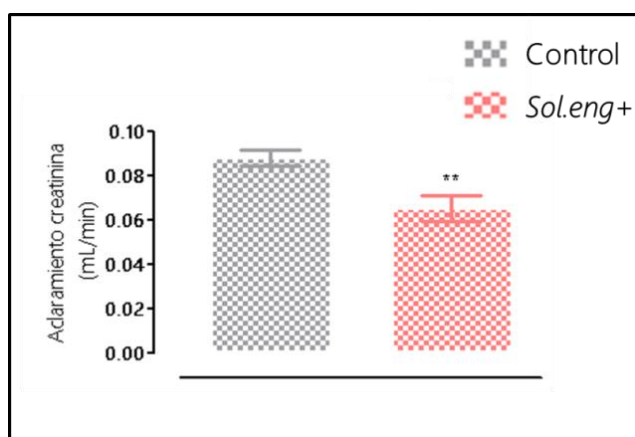
**FIGURA 24:**

Tinción de Hematoxilina-eosina de riñones de ratones Control y *sol.eng+*

Imagen representativa de la tinción de H&E correspondiente a riñones controles y *sol.eng+*. Las flechas señalan infiltrado celular (arriba derecha) y depósitos hialinos (abajo derecha).

Estudiamos las alteraciones presentes en los riñones procedentes de ratones controles y *sol.eng+* mediante la tinción de Hematoxilina-eosina (H&E). En ellas apreciamos un aumento de infiltración de células inflamatorias y depósitos hialinos en la zona medular de los riñones de los ratones *sol.eng+* comparados con los de los controles (FIGURA 24).

Tras observar estos resultados, quisimos comprobar si la función renal de estos ratones estaba alterada. Para ello, evaluamos la tasa de filtración glomerular mediante la medición del aclaramiento de creatinina de estos ratones. Observamos que el aclaramiento de creatinina es menor en los ratones que sobre-expresan sEng, que en los WT (FIGURA 25).



**FIGURA 25:** Tasa de filtración glomerular en ratones Control y *sol.eng+*

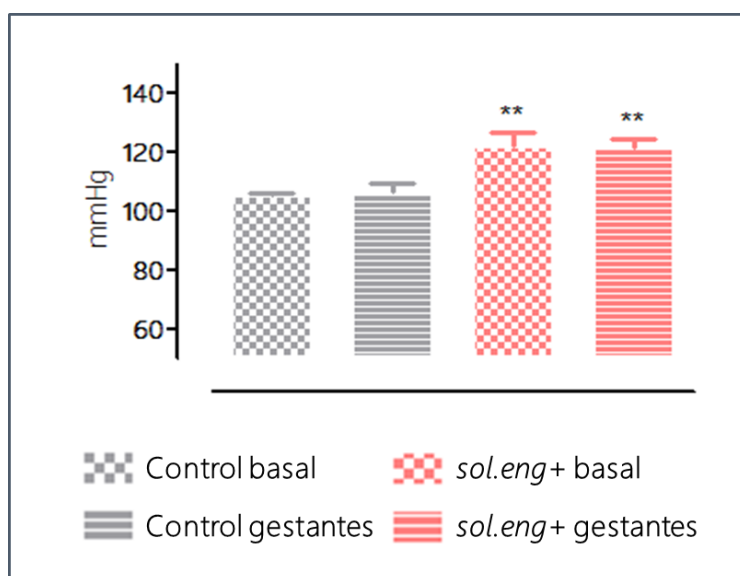
Medida del aclaramiento de creatinina. Control (n=7), *sol.eng+* (n=9). Análisis estadístico t student para datos paramétricos: \*\*p<0,01 vs Control. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

Por tanto, a la vista de estos resultados, podemos afirmar que la sobre-expresión de sEng induce alteraciones renales, tanto estructurales como funcionales.

## 2. Estudio de los efectos durante la gestación.

Quisimos comprobar si, en estos ratones, el estado de gestación contribuía a un agravamiento de estos síntomas clínicos. Para ello, cruzamos hembras *sol.eng+* y hembras controles con machos controles. Medimos la presión arterial sistólica antes

y al final de la preñez. Tras analizar estos resultados, vemos que la presión arterial sistólica no se modifica por la gestación, ni en las hembras *sol.eng+* ni en las hembras control, manteniéndose las mismas diferencias entre ambos grupos, antes y al final de la preñez (FIGURA 26).



**FIGURA 26:** Presión arterial de ratones Control y *sol.eng+* basal y gestantes

Medida de presión sistólica en ratones controles basal y gestantes, y *sol.eng+* basal y gestantes de 18 días. Control basal (n=9), Control gestantes (n=9), *sol.eng+* basal (n=11), *sol.eng+* gestantes (n=9). Análisis estadístico ANOVA de doble vía  $**p<0,01$  vs Control. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

Unas de las principales críticas realizadas a los modelos de preeclampsia, como ya hemos señalado en el apartado de *Introducción*, es que, en la mayoría de ellos, la sintomatología es independiente del estado de gestación, es decir, los síntomas clínicos se reproducen tanto en hembras gestantes como no gestantes, e incluso en machos. Por tanto, a diferencia de lo que ocurre en preeclampsia, la placenta no interviene en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, aunque este modelo sí

parece representar las características de la segunda etapa de la enfermedad, que corresponden a alteraciones a nivel sistémico (Roberts & Hubel, 2009), nos planteamos el empleo de otro modelo donde podamos estudiar de manera más fisiológica el efecto de sEng en preeclampsia.

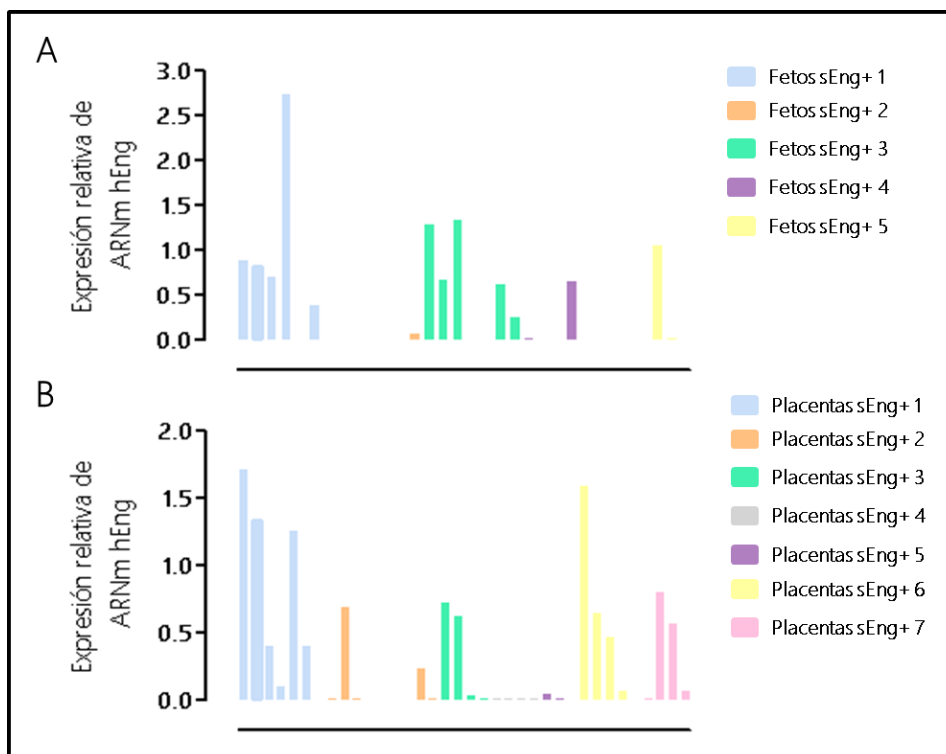
## Modelo animal de preeclampsia “sEng+”

Para el estudio del papel de sEng en preeclampsia, diseñamos un modelo animal que podría representar de manera más fisiopatológica las alteraciones que aparecen a lo largo de la gestación en esta enfermedad.

Para la obtención de este modelo, cruzamos hembras de fondo genético híbrido CBA x C57/BL6 (WT) con machos transgénicos *sol.eng+*, y hembras WT con machos WT, a las que llamamos gestantes sEng+ y gestantes WT, respectivamente.

### 1. Caracterización del modelo

Primero, comprobamos los niveles de expresión de hEng de todos los fetos de la camada de cinco gestantes sEng+ distintas mediante qPCR (FIGURA 27.A). Del mismo modo, comprobamos los niveles de expresión de hEng de todas las placentas de una camada de siete gestantes sEng+ (FIGURA 27.B). Observamos, que, tanto cada feto como cada placenta, tienen niveles distintos de hEng. Existen fetos y placentas que no expresan nada, que se corresponderían con fetos WT, y fetos y placentas que expresan mucha hEng, que se corresponderían con fetos *sol.eng+*.

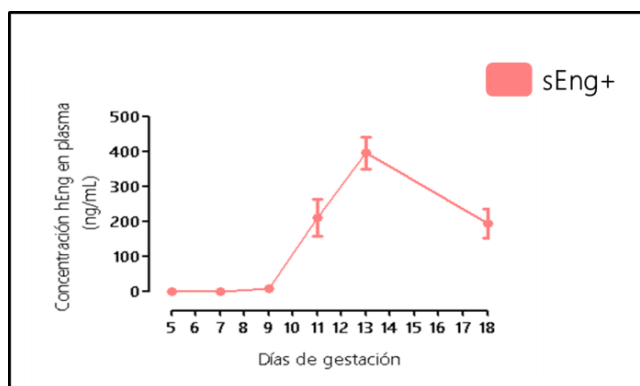
**FIGURA 27:**

Expresión de sEng humana en fetos y placentas de gestantes sEng+

**A.** Niveles de ARNm de hEng de cada uno de los fetos de 5 gestantes sEng+. **B.** Niveles de ARNm de hEng de cada una de las placentas de 7 gestantes sEng+.

Además, mediante el empleo de un kit de ELISA para hEng, observamos que en el plasma de las gestantes sEng+ existe un aumento de la concentración de hsEng a partir del día 9 de gestación, y alcanza su pico máximo en el 13º día, que se mantiene elevado hasta el final de la preñez (FIGURA 28). Por tanto, confirmamos que, en nuestro modelo de preeclampsia, las gestantes sEng+ tienen niveles elevados de sEng en plasma.





**FIGURA 28:** Concentración de sEng humana en plasma de gestantes sEng+

Concentración de hEng en plasma de gestantes sEng+ a diferentes días de gestación. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM.

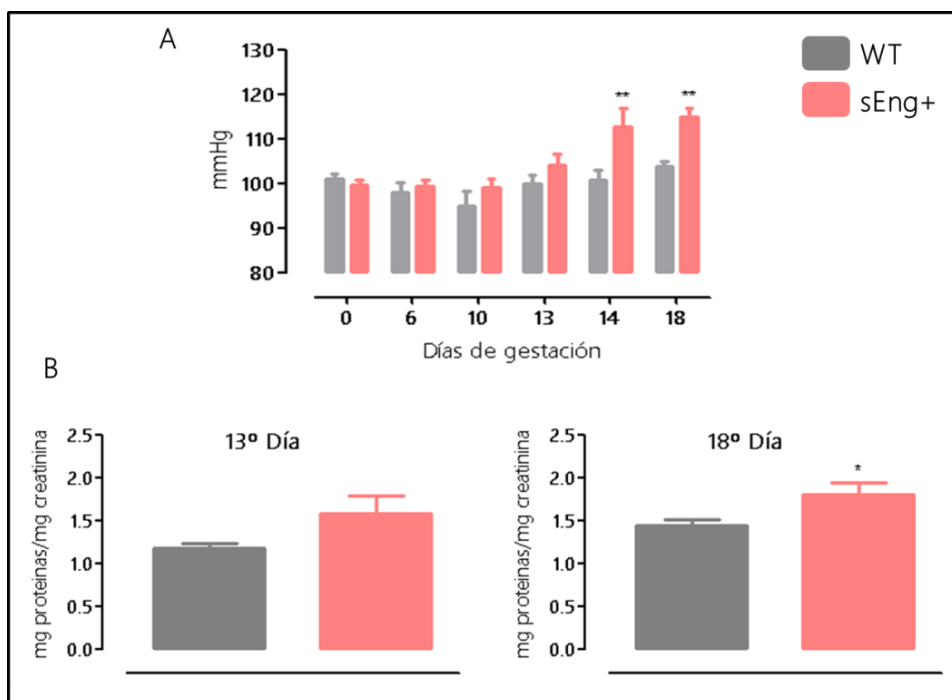
Para analizar el papel de sEng en la preeclampsia, estudiamos a las gestantes a día 13 y a día 18 de gestación. Por un lado, quisimos comprobar si el día 13 se corresponde con el momento dónde tiene lugar el mayor agravamiento de los síntomas, ya que es cuando observamos el pico de máxima expresión de sEng. Por otro lado, estudiamos las gestantes a día 18, ya que corresponde con las últimas etapas de la gestación y es donde en preeclampsia se observa la aparición de los síntomas clínicos.

## 2. Síntomas clínicos de la preeclampsia

Siguiendo con los objetivos propuestos, una vez comprobado que nuestro modelo animal presenta altas concentraciones plasmáticas de sEng, analizamos la relación de los niveles plasmáticos de sEng con sintomatología de la preeclampsia.

## 2.1. Hipertensión y proteinuria

Los principales síntomas clínicos que se presentan en mujeres con preeclampsia son la hipertensión y proteinuria. Por ello, medimos los niveles de presión arterial de los ratones gestantes de nuestro modelo a diferentes días de la preñez (FIGURA 29.A). Además, calculamos la tasa de excreción de proteínas en la orina (FIGURA 29.B) a los días 13 y 18 de gestación.



**FIGURA 29:** Presión arterial sistólica y proteinuria de gestantes WT y sEng+

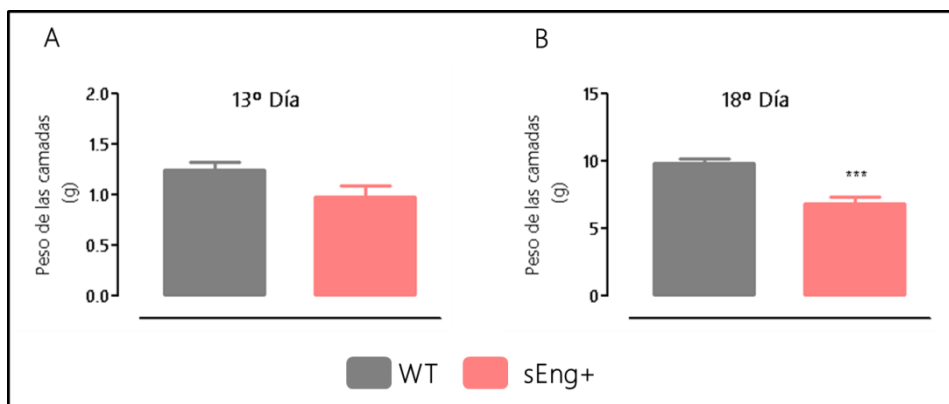
**A.** Presión arterial sistólica medida en cola a diferentes días de gestación, en las gestantes WT y sEng+. Análisis estadístico ANOVA de doble vía: \*\* $p < 0,01$  vs WT **B.** Medidas de proteinuria a día 13 y 18 de gestación en WT y sEng+. WT día 13 (N=8), sEng+ día 13 (N=9), WT día 18 (N=19), sEng+ día 18 (N=21). Análisis estadístico U de Mann Whitney para datos no paramétrico (día 13), y t de student para datos paramétrico (día 18): \* $p < 0,05$  vs WT. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM

En relación con la medida de presión arterial, vemos un incremento progresivo de presión arterial a partir de día 13, donde detectamos una tendencia a ser mayor en las ratonas sEng+, pero no llega a ser estadísticamente significativo hasta el día 14 de gestación, lo que corresponde con las últimas etapas de la misma (FIGURA 29.A).

En cuanto a la excreción de proteínas en orina, observamos que, a día 13 de gestación, aunque no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,1$ ), se observa un incremento en las gestantes sEng+. A día 18 de gestación, estas diferencias se acentúan, siendo significativamente mayor en las gestantes sEng+ con respecto a las WT (FIGURA 29.B).

## 2.2. Reducción del peso de las camadas

Otro de las alteraciones observadas en preeclampsia es la reducción del crecimiento fetal. En nuestro caso, decidimos comparar el peso de todos los fetos de la camada en conjunto (FIGURA 30) en lugar de calcular el peso medio de los fetos a nivel individual, donde encontramos mucha variabilidad. Esta variabilidad se debe a que en algunas ocasiones encontramos camadas con un número normal de fetos, pero con peso y tamaño muy reducido, y otras, camadas muy reducidas en número, pero con un tamaño y peso normal. Esto es debido a que los roedores tienen la capacidad de poder redistribuir el aporte sanguíneo hacia los fetos, según la demanda y necesidades. En situaciones en las que el aporte sanguíneo o nutritivo se ve reducido, disminuye el número de fetos viables, manteniendo en lo posible el peso de los supervivientes, lo que no ocurre en humanos, observando en este caso una reducción del tamaño fetal.

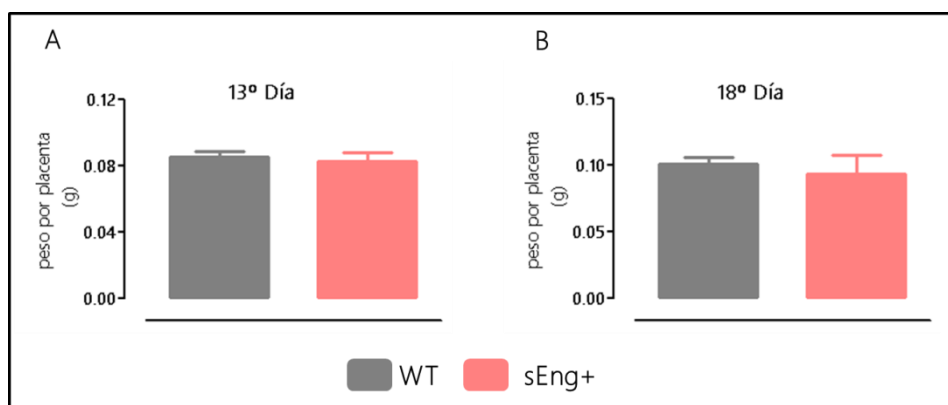


**FIGURA 30:** Peso de las camadas de gestantes WT y sEng+

**A.** Peso de las camadas de las gestantes WT y sEng+ a día 13. WT (N=12), sEng+ (N=14). Análisis estadístico U de Mann Whitney para datos no paramétricos. **B.** Peso de las camadas de las gestantes WT y sEng+ a día 18. WT (N=15), sEng+ (N=19). Análisis estadístico t de student para datos paramétrico: \*\*\* $p < 0,0001$  vs WT. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

Observamos que en el 13º día no hay diferencias en el peso de las camadas (FIGURA 30.A). En cambio, en el día 18 de gestación, el peso de las camadas es significativamente menor en las gestantes sEng+ (FIGURA 30.B).

Al extraer los fetos, pudimos apreciar que, independientemente del peso fetal, la placenta no variaba en tamaño, y no había diferencias entre las placentas de WT y las de sEng+. Para confirmar este dato y asegurarnos que la reducción observada en el tamaño fetal era independiente del tamaño placentario, nos planteamos calcular el peso medio de las placentas de cada camada (FIGURA 31). En este caso, lo que nos interesa es observar si existen diferencias en el tamaño de las placentas a nivel individual con respecto a las WT, por ello calculamos el peso medio por placenta, en lugar de calcular la masa placentaria del conjunto de la camada.

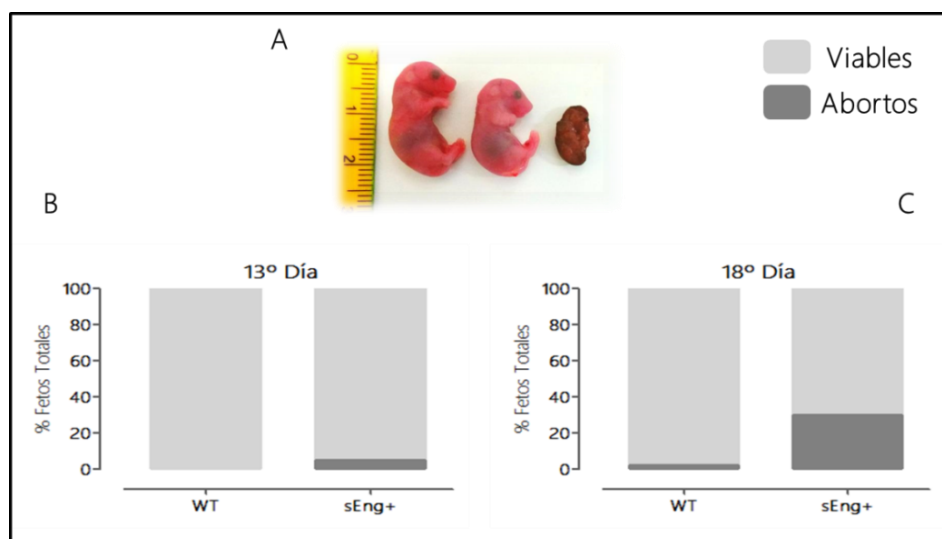


**FIGURA 31:** Peso de las placentas de gestantes WT y sEng+

**A.** Peso medio de las placentas de cada camada de las gestantes WT y sEng+ a día 13 de gestación. WT (N=7), sEng+ (N=7). Análisis estadístico t de student para datos paramétricos. **B.** Peso medio de las placentas de cada camada de las gestantes WT y sEng+ a día 18 de gestación. WT (N=9), sEng+ (N=8). Análisis estadístico U de Mann Whitney para datos no paramétricos. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

No observamos diferencias en el tamaño de las placentas ni a día 13 ni 18 de gestación, por lo que confirmamos que la reducción del tamaño fetal es independiente del peso de la placenta.

Durante la extracción de placentas y fetos para su posterior pesado, observamos que las hembras sEng+ tenían numerosos fetos necrosados y fetos no viables, con placentas reabsorbidas, lo que contabilizamos como abortos. Contabilizamos el porcentaje de abortos de las gestantes sEng+ comparándolas con las WT. A día 13 de gestación la tasa de abortos de las sEng+ era de aproximadamente el 5%, mientras que en las WT era un 0% (FIGURA 32.B). Esta tasa de abortos se vió incrementada a día 18 de gestación, donde fue aproximadamente de un 13,4%, mientras que en las WT de apenas un 1% (FIGURA 32.C).



**FIGURA 32:** Porcentajes de abortos de gestantes WT y sEng+

**A.** Imagen representativa del tamaño de los fetos a día 18 de gestación de sEng+ donde encontramos fetos con un tamaño similar a los de las WT, fetos con un tamaño reducido, y abortos (fetos necrosados). **B.** Porcentaje de fetos vivos (viabiles) y abortos (necrosados y no viabiles) en las gestantes WT y sEng+. Analizamos el número de abortos presentes en 100 fetos WT y en 100 fetos sEng+. **C.** Porcentaje de fetos viabiles y abortos en las gestantes WT y sEng+. Analizamos el número de abortos entre 212 fetos WT y 224 fetos sEng+.

A la vista de estos resultados, podemos afirmar que sEng induce síntomas clínicos característicos de preeclampsia: hipertensión, proteinuria y reducción del tamaño fetal, en un modelo animal de la enfermedad. El modelo animal empleado, sEng+, parece representar de "manera fisiológica" lo que ocurre en preeclampsia, lo que lo convierte en un buen modelo para el estudio del papel de sEng en la fisiopatología de esta enfermedad.

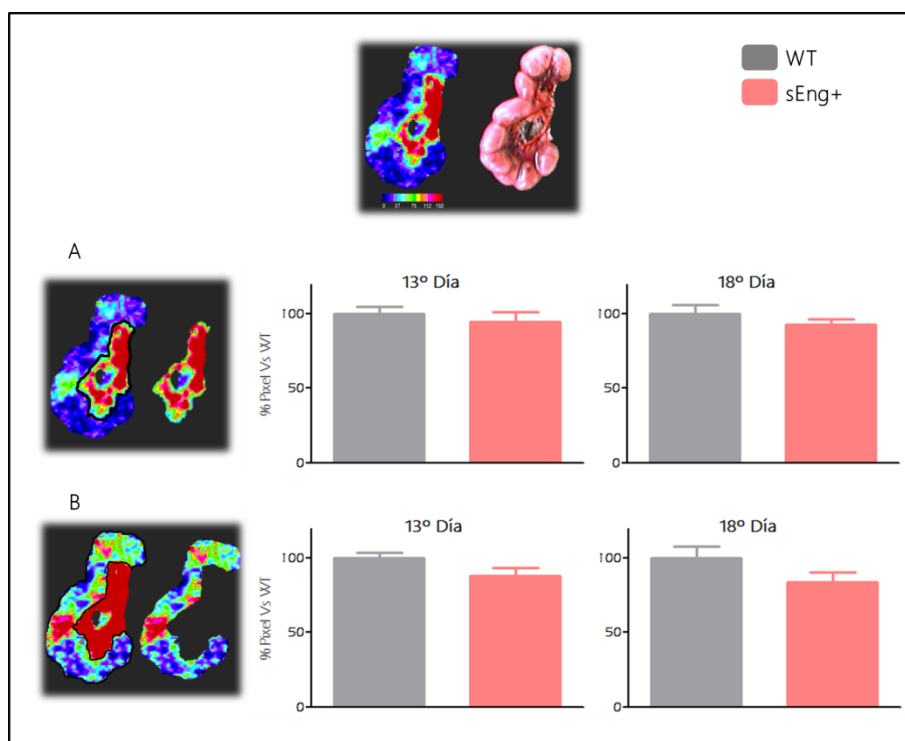
### 3. Alteraciones placentarias presentes en preeclampsia

Además de los efectos de sEng sobre los síntomas clínicos característicos de la preeclampsia, comprobamos si el exceso de sEng plasmática de nuestro modelo animal contribuye al resto de las alteraciones placentarias, descritas en esta enfermedad.

#### 3.1. Flujo útero-placentario

Estudiamos el flujo útero-placentario mediante el empleo de la técnica de Láser Doppler.

En la Figura 33 se muestra una imagen representativa del flujo útero-placentario de un ratón a día 18 de gestación. Examinamos la imagen de dos maneras. Por un lado, analizamos la zona correspondiente al flujo uterino, lo que se corresponde con el aporte sanguíneo de la madre hacia las placentas (FIGURA 33.A), donde no observamos diferencias, ni a día 13 ni 18 de gestación, entre las WT y sEng+. Por otro lado, estudiamos la zona correspondiente al flujo fetal con sus placentas correspondientes (FIGURA 33.B). En este caso, a pesar de que tampoco se pueden observar diferencias estadísticamente significativas entre WT y sEng+ a ninguno de los dos tiempos de preñez, podemos apreciar una tendencia a ser menor en las gestantes sEng+, más acentuada a día 18, en donde las ratonas sEng+ tienen una reducción del flujo placentario-fetal de aproximadamente un 20% con respecto al flujo de los WT.



**FIGURA 33:** Flujo uterino y fetal de gestantes WT y sEng+

**A.** Flujo sanguíneo correspondiente al aporte de sangre de la madre hacia las placentas en gestantes WT y sEng+ a día 13 y 18 de preñez. WT día 13 (N=7), sEng+ día 13 (N=6), WT día 18 (N=10), sEng+ día 18 (N=13). **B.** Flujo sanguíneo correspondiente a los fetos y placentas de gestantes WT y sEng+ a día 13 y 18 de preñez. WT día 13 (N=7), sEng+ día 13 (N=6), WT día 18 (N=9), sEng+ día 18 (N=14). Análisis estadístico t de student para datos paramétricos. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM. El flujo está representado como el tanto por ciento de la cuantificación de los pixeles del área analizada con respecto a la media de la cuantificación de los controles.

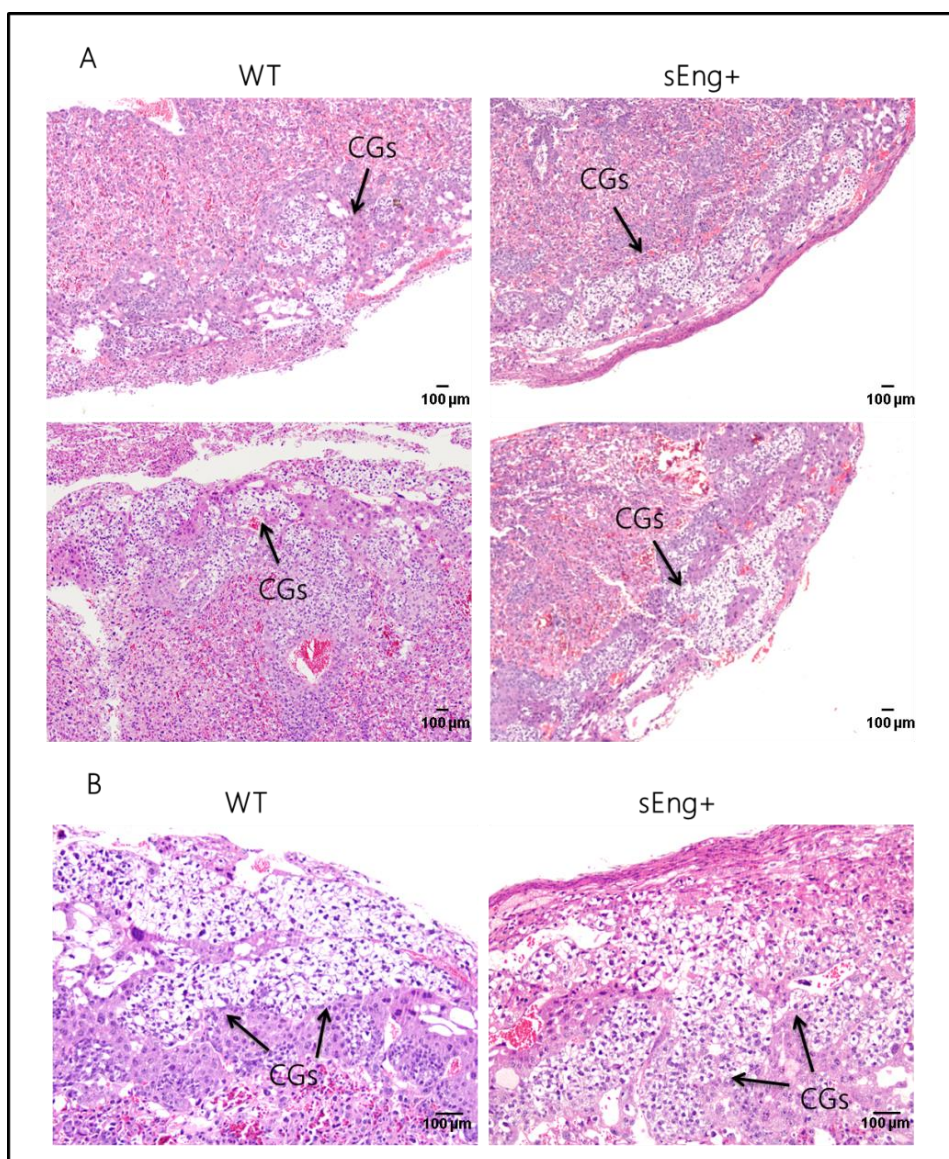
### 3.2. Alteraciones estructurales en la placenta

Para evaluar si los altos niveles circulantes de sEng se asocian con alteraciones en la estructura de la placenta, realizamos el análisis histológico de placentas extraídas a día 13 y 18 de preñez de gestantes WT y sEng+.



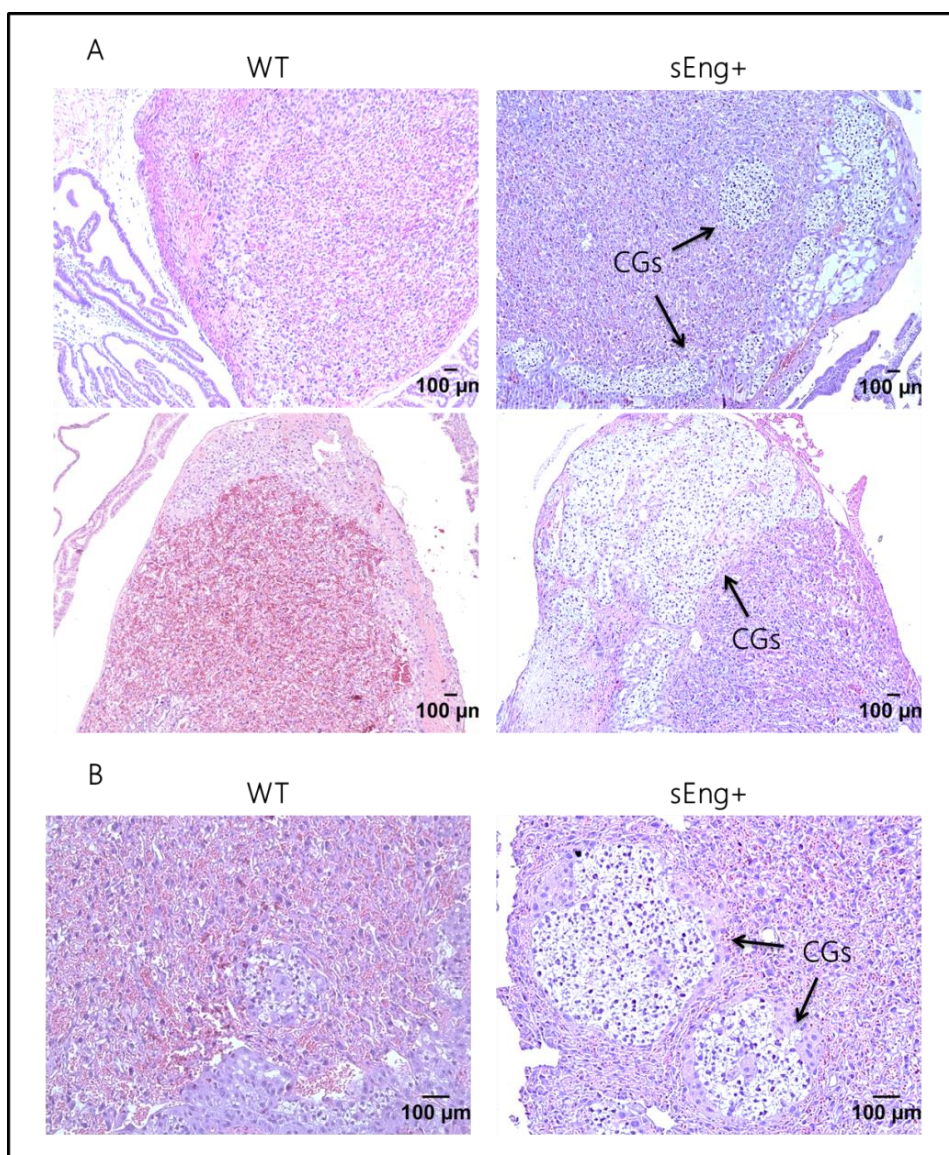
Mediante el análisis de la tinción de H&E, pudimos apreciar unas grandes zonas de células de aspecto vacuolado, con un citoplasma grande y claro, distribuidos en grandes acúmulos, ubicados mayoritariamente en la zona basal de la placenta. Debido a su morfología y su distribución en la placenta, pensamos que estas células podrían corresponder con células de glucógeno (GCs). Como comentamos en el apartado de *Introducción*, las GCs son células exclusivas de las placentas de los roedores que aparecen en la zona basal formando agrupaciones. Estas células van incrementando su extensión hasta, aproximadamente, el día 15,5 de gestación, cuando comienzan a desaparecer hasta el final de la misma (Coan et al, 2006; Coan et al, 2004; Waddell et al, 2000).

Observamos que las células GCs están presentes en las placentas procedentes de las gestantes WT y sEng+ a día 13 (FIGURA 34). Sin embargo, en las placentas WT de día 18 de gestación los acúmulos de este tipo celular estaban muy reducidos, al contrario de lo sucede en las placentas procedentes de sEng+, donde los acúmulos se mantenían de forma similar a lo que nos encontramos en las placentas de las gestantes, tanto WT como sEng+ a día 13 (FIGURA 35).



**FIGURA 34:** Tinción de H&E de placentas de gestantes WT y sEng+ a día 13

Imágenes representativa de la tinción de H&E correspondiente a placentas de día 18 de gestación de WT y sEng+. Las flechas señalan las zonas de acúmulos de CGs. Micrografías obtenidas mediante cámara adosada a microscopio óptico con 100 aumentos (A) y 200 aumentos (B).

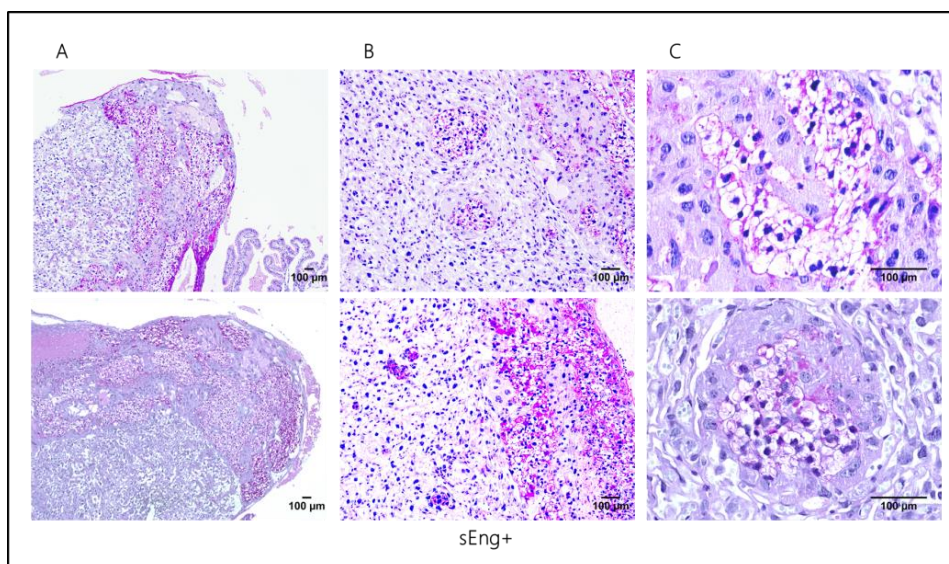


**FIGURA 35:** Tinción de H&E de placentas de gestantes WT y sEng+ a día 18

Imágenes representativa de la tinción de H&E correspondiente a placentas de día 18 de gestación de WT y sEng+. Las flechas señalan las zonas de acúmulos de CGs. Micrografías obtenidas mediante cámara adosada a microscopio óptico con 100 aumentos (A) y 200 aumentos (B).



Para confirmar que los acúmulos de células con aspecto vacuolado correspondían con CGs, realizamos una tinción de PAS. Esta tinción nos permite detectar polisacáridos, ya que éstos quedan marcados con una coloración morada-rosácea. Tras el análisis de las preparaciones vemos que, efectivamente, en el citoplasma de estas células existen acúmulos de polisacáridos, probablemente correspondientes a glucógeno (FIGURA 36).

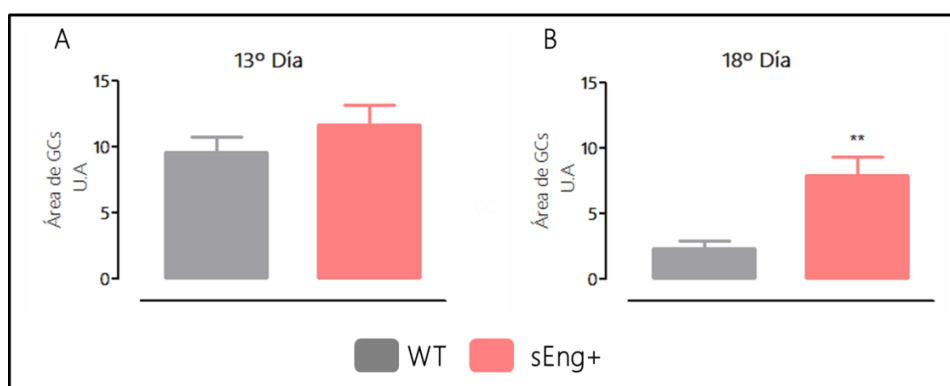


**FIGURA 36:** Tinción de PAS de placentas de gestantes sEng+

Imágenes representativas de la tinción de PAS correspondiente a placentas sEng+. Micrografías obtenidas mediante cámara adosada a microscopio óptico con 100 (A), 200 (B) y 600 (C) aumentos

Se ha demostrado que placentas de roedores con alteraciones en el estado de gestación, presentan grandes áreas de acúmulos de GCs al final de la misma (Akison et al, 2017). Por tanto, nos planteamos cuantificar el área ocupada por las CGs en las placentas de nuestro modelo de preeclampsia.

Tras examinar los resultados, podemos afirmar que en las placentas de día 13 de gestación no hay diferencias en el área ocupada por las GCs entre las de las gestantes WT y las sEng+. Sin embargo, observamos una disminución de éste área en las placentas de las hembras WT a día 18 con respecto a las de las sEng+, ya que, en las placentas de las hembras sEng+ el área ocupada se mantiene similar al 13º y 18º día de preñez, sin que se produzca una reducción significativa de las mismas (FIGURA 37).

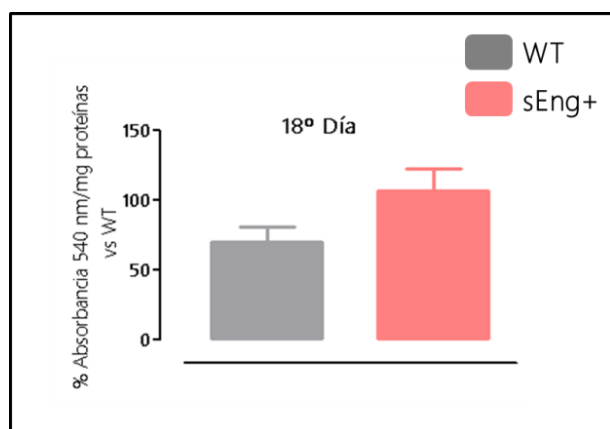


**FIGURA 37:** Área ocupada por CGs en placentas de gestantes WT y sEng+

**A.** Área ocupada por GCs en placentas de WT y sEng+ a día 13 de gestación. WT (N=18), sEng+ (N=16). Análisis estadístico U de Mann Whitney para datos no paramétricos. **B.** Área ocupada por GCs en placentas de WT y sEng+ a día 18 de gestación. WT (N=13), sEng+ (N=15). Análisis estadístico t de student para datos paramétricos: \*\*p<0,01 vs WT. Cada barra representa la media ± EEM.

Por otro lado, se ha descrito que las placentas procedentes de gestantes con complicaciones como preeclampsia, diabetes gestacional o restricción del crecimiento fetal, IUGF, presentan mayor concentración de glucógeno (Akison et al, 2017). Por ello, en nuestro modelo de preeclampsia, nos planteamos medir la concentración de glucógeno en placentas sEng+ y WT a día 18 de gestación.

Al comparar la cantidad de glucógeno, observamos una mayor concentración en las placentas procedentes de las gestantes sEng+ en comparación con las WT, aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas ( $p=0,07$ ) (FIGURA 38).



**FIGURA 38:** Concentración de glucógeno en placentas de gestantes WT y sEng+

Concnetración de glucógeno en las placentas sEng+ y WT a día 18 de gestación. Los datos se representan en tatno por ciento con respecto a la absorbancia media obtenida en las WT. WT (N=13), sEng+ (N=14). Análisis estadístico t student para datos paramétricos. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

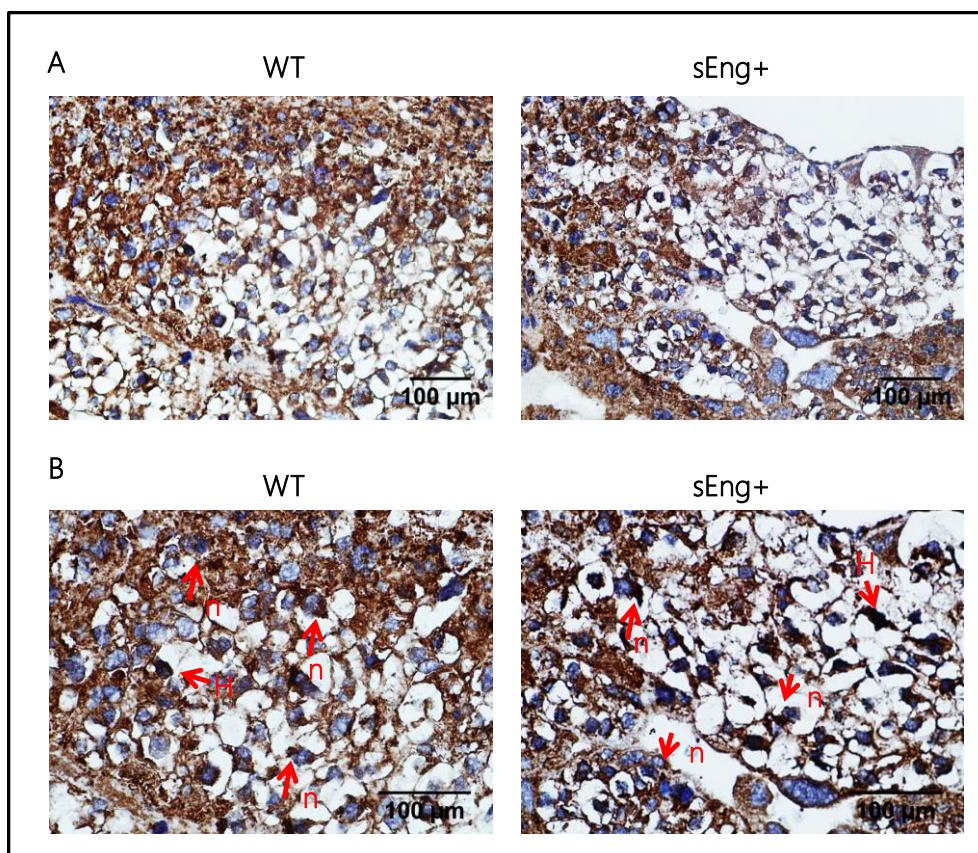
En resumen, en nuestro modelo, el incremento de sEng en plasma podría estar contribuyendo al mantenimiento de los acúmulos de células de glucógeno, y por tanto, a un aumento de la concentración de glucógeno en la placenta, al final de la gestación.

### 3.3. Hipoxia placentaria

En preeclampsia se ha descrito una disminución de la concentración de oxígeno en la placenta, lo que da lugar a un aumento de la hipoxia placentaria, debido, probablemente, a una reducción del flujo útero-placentario (Lunell et al, 1982;

Roberts & Post, 2008; Soleymanlou et al, 2005; Zamudio et al, 2007). Analizamos si en nuestro modelo existe también un aumento de hipoxia placentaria, por lo que evaluamos la expresión del factor HIF-1 $\alpha$  en las placentas de los ratones WT y sEng+.

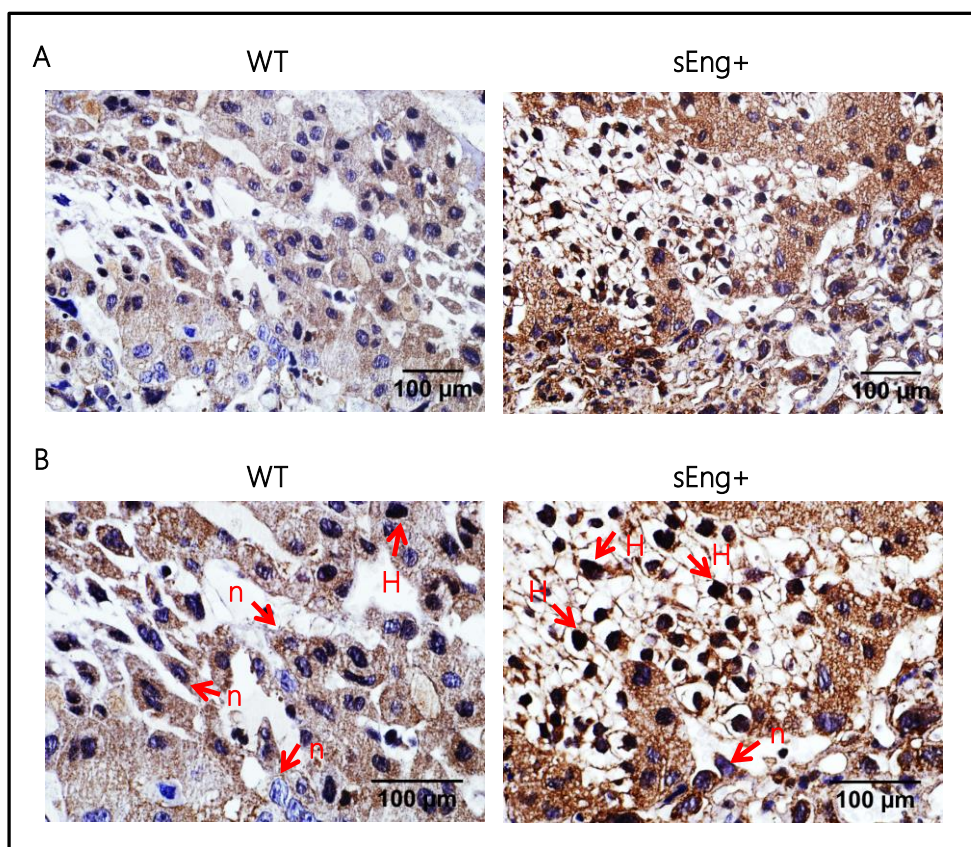
La síntesis de HIF-1 $\alpha$  se produce de forma constitutiva en el citoplasma. En condiciones de normoxia es rápidamente degradado, mientras que en hipoxia, esta degradación está bloqueada y HIF-1 $\alpha$  se transloca al núcleo, donde actúa como factor de transcripción (Depping et al, 2008; Lee et al, 2004). Detectamos mediante inmunohistoquímica la expresión de HIF-1 $\alpha$  nuclear en las placentas procedentes de hembras WT y sEng+ a día 13 y 18 de gestación. Observamos que a día 13 de preñez, no se aprecian diferencias en la expresión de HIF-1 $\alpha$  entre las células de las placentas procedentes de las WT y las sEng+. La mayoría de los núcleos de las células, en ambos tipos de placentas, presentan un color azulado, lo que nos indica que HIF-1 $\alpha$  no se está expresando a nivel nuclear (FIGURA 39). Sin embargo, a día 18 de gestación, observamos que las CGs, mayoritarias en las placentas de gestantes sEng+, presentan nucleos más oscuros, casi negros, en comparación con las células colindantes y con las células de las placentas WT (FIGURA 40). Esto nos revela que HIF-1 $\alpha$  no se está degradando en el citoplasma, lo que manifiesta que las células GCs presentan un estado de hipoxia.



**FIGURA 39:** Expresión de HIF-1 $\alpha$  en placentas WT y sEng+ a día 13

Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de HIF-1 $\alpha$  correspondiente a placentas de día 13 de gestación de WT y sEng+. Las flechas muestran los núcleos de células normóxicas (n) e hipóxicas (H). Micrografías obtenidas mediante cámara adosada a microscopio óptico con 400 aumentos (A) y 600 aumentos (B).





**FIGURA 40:** Expresión de HIF-1 $\alpha$  en placentas WT y sEng+ a día 18

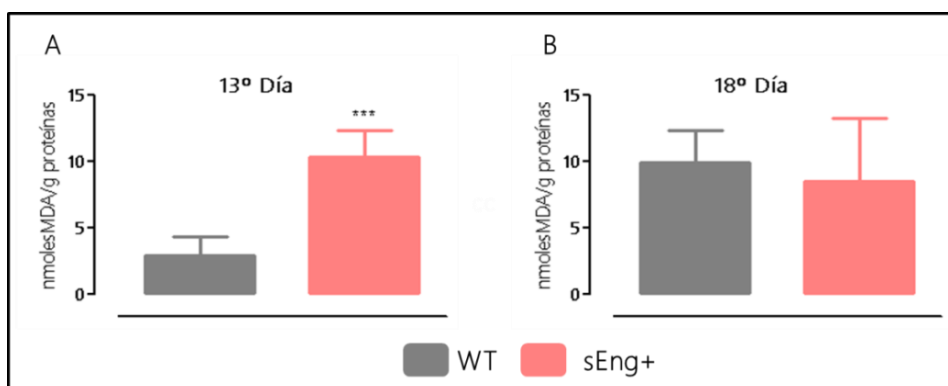
Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de HIF-1 $\alpha$  correspondiente a placentas de día 18 de gestación de WT y sEng+. Las flechas muestran los núcleos de células normóxicas (n) e hipóxicas (H). Micrografías obtenidas mediante cámara adosada a microscopio óptico con 400 aumentos (A) y 600 aumentos (B).

Por tanto, en nuestro modelo animal sEng+ no observamos grandes zonas hipóxicas en la placenta, sin embargo las CGs, presentes al final de la gestación, expresan altos niveles de HIF-1 $\alpha$  nuclear.

### 3.4. Estrés oxidativo

Otra de las alteraciones descritas en preeclampsia consiste en un aumento de ROS, y como consecuencia, existe un aumento de peroxidación lipídica (Borzychowski et al, 2006; Burton & Jauniaux, 2011; Redman & Sargent, 2009).

Para estudiar si en nuestro modelo se produce un incremento de estrés oxidativo, medimos la concentración de peróxidos lipídicos, expresados como MDA, en las placentas de día 13 y 18 de gestación, tanto de WT como sEng+ (FIGURA 41).



**FIGURA 41:** Concentración de MDA en placentas de gestantes WT y sEng+

**A.** Concentración de MDA de placentas extraídas a día 13 de gestación procedentes de WT y sEng+. WT (N=20), sEng+ (N=21). Análisis estadístico U de Mann Whitney para datos no paramétrico: \*\*\* $p < 0,0001$  vs WT. **B.** Concentración de MDA de placentas extraídas a día 18 de gestación procedentes de WT y sEng+. WT (N=12), sEng+ (N=11). Análisis estadístico U de Mann Whitney para datos no paramétrico. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

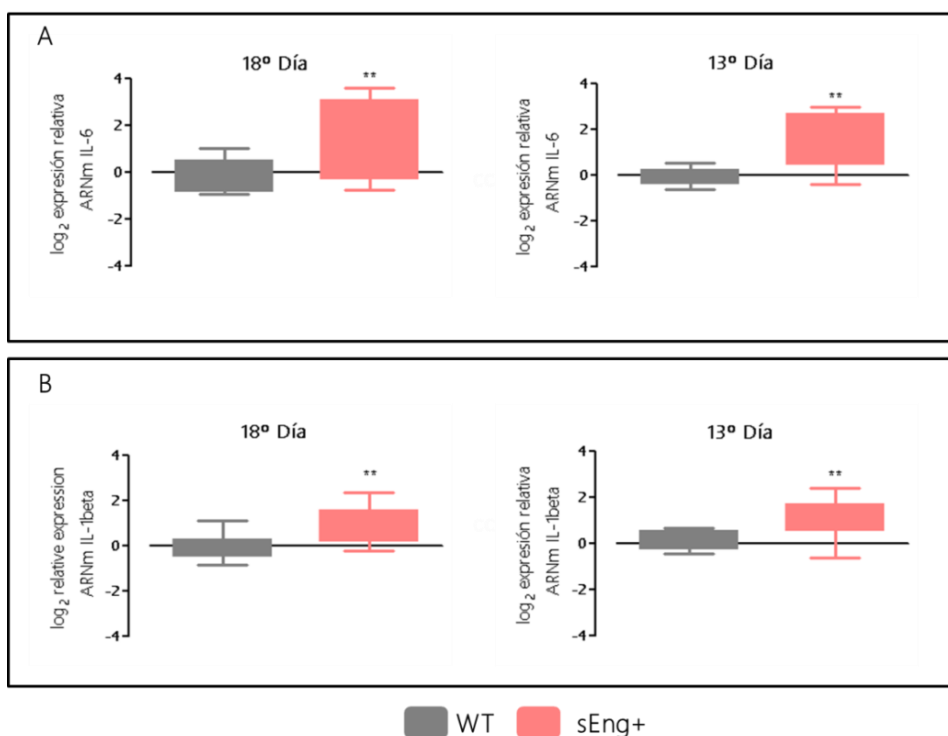
En el 13º día vemos una mayor concentración de MDA en las placentas de las gestantes sEng+ comparadas con las de las WT, las cuales tienen una concentración muy baja, incluso en muchas muestras, el valor fue indetectable (por debajo del blanco), lo que tomamos como valor de 0 (FIGURA 41.A). Por el contrario, a día 18 de gestación no vemos diferencias en la concentración de MDA entre las placentas de las WT y las sEng+ (FIGURA 41.B). Este hecho puede deberse a que en las últimas

etapas de la gestación se produce, de manera fisiológica, un incremento de estrés oxidativo (Gupta et al, 2009). Sin embargo, en nuestro modelo sEng+, el aumento de estrés oxidativo se da de manera más temprana en la gestación.

### 3.5. Inflamación

Por otro lado, medimos la expresión de las citocinas IL-6 y IL-1 $\beta$  en las placentas de las gestantes WT y sEng+, tanto a día 13 como 18 de gestación, ya que el aumento de estas citocinas pro-inflamatorias ha sido descrito en preeclampsia (Conrad et al, 1998; Hennessy et al, 1999; Szarka et al, 2010). Observamos mediante qPCR, un aumento de la expresión relativa de ARNm de ambas citocinas en las placentas procedentes de sEng+ en comparación a las de WT (FIGURA 42).

Por tanto, podemos deducir que nuestro modelo animal presenta niveles elevados de factores pro-inflamatorios, al igual que ocurre en preeclampsia.

**FIGURA 42:**

Expresión de citoquinas inflamatorias en placentas de gestantes WT y sEng+

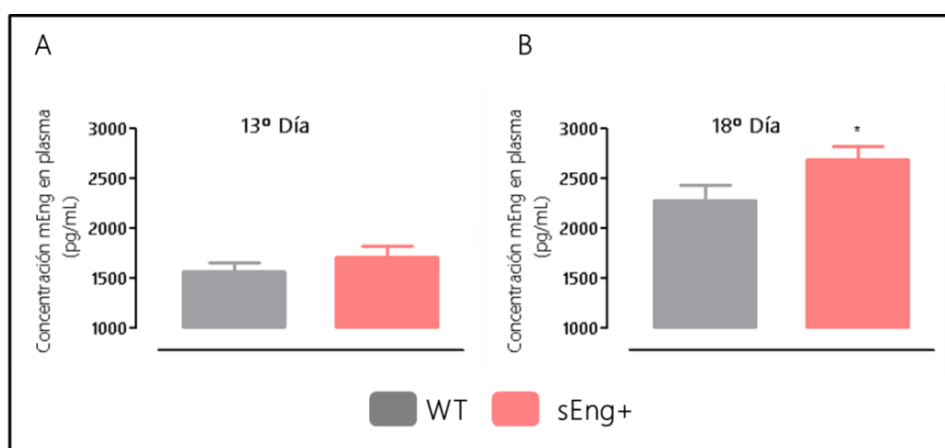
**A.** Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de IL-6 en las placentas a día 13 y 18 de gestación procedentes de WT y sEng+. WT día 13 (N=9), sEng+ día 13 (N=12), WT día 18 (N=10), sEng+ (N=14). **B.** Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de IL-1β en las placentas a día 13 y 18 de gestación procedentes de WT y sEng+. WT día 13 (N=9), sEng+ día 13 (N=12), WT día 18 (N=11), sEng+ (N=14). Análisis estadístico t de student para datos paramétrico. \*\*p<0,01 vs WT. Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras WT. Se representa un *box plot* 10-90 percentil.

### 3.6. Concentración plasmática de receptores solubles

En el plasma de mujeres con preeclampsia se han detectado alteraciones en las concentraciones de ciertos factores solubles, semanas antes de la aparición de los síntomas clínicos. Principalmente, se ha descrito un aumento de los receptores sEng

y sFlt1, así como una disminución del factor PlGF. Comprobamos si en nuestro modelo animal, los altos niveles de sEng humana también se asocian con las alteraciones descritas en estos factores solubles.

En primer lugar, medimos la concentración de sEng endógena, es decir, de ratón, en el plasma de gestantes a día 13 y 18 de preñez de WT y sEng+ (FIGURA 43).



**FIGURA 43:** Concentración de mEng en plasma de gestantes WT y sEng+

Concentración plasmática de sEng de ratón en gestantes WT y sEng+ a día 13 (A) y día 18 (B) de preñez. WT día 13 (N=11), sEng+ día 18 (N=15), WT día 18 (N=10), sEng+ día 18 (N=13). Análisis estadístico t de student para datos paramétrico: \* $p < 0,05$  vs WT. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

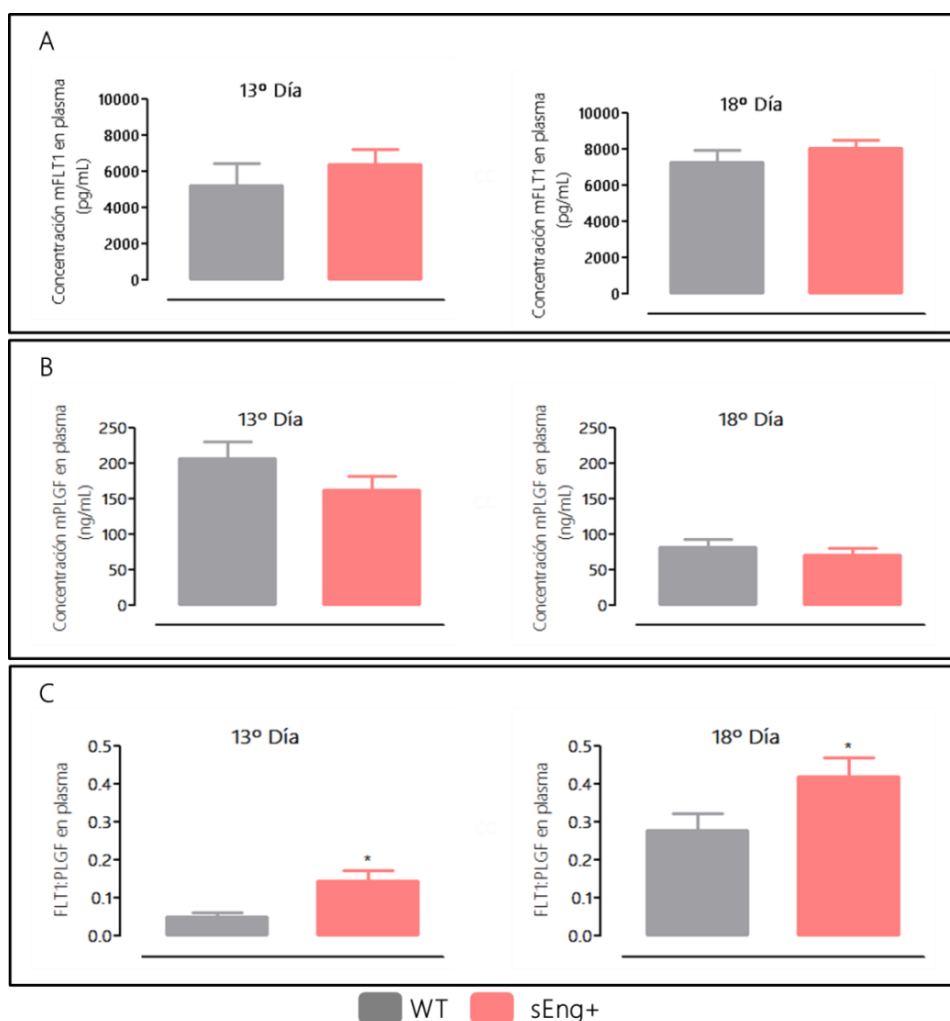
Al analizar los datos obtenidos, vemos que a día 13 no hay diferencias significativas entre la concentración de sEng endógena entre los WT y los sEng+, con unos niveles de aproximadamente 1600 pg/mL. Sin embargo, la concentración a día 18, ronda los 2300 pg/mL en el plasma de las gestantes WT y 2700 pg/mL en el las sEng+, diferencia estadísticamente significativa. Por tanto, podemos apreciar en nuestros resultados que existe un aumento de sEng endógena a medida que

avanza la gestación, y este aumento es mayor en las gestantes sEng+ que en WT (FIGURA 43).

Estos datos nos permiten afirmar el aumento de la concentración plasmática de sEng humana, se asocia con un incremento en la concentración plasmática de sEng endógena de ratón.

Al medir la concentración plasmática de sFlt1, no vemos diferencias significativas, ni a día 13 ni 18 de gestación, entre las WT y las sEng+, a pesar de apreciar una pequeña tendencia a ser mayor en las gestantes sEng+. En este caso, también observamos un incremento en la concentración a medida que avanza la gestación, pasando de unos 5500 pg/mL a 8000 pg/mL (FIGURA 44.A). Del mismo modo, al medir la concentración plasmática de PlGF, observamos de nuevo que a pesar de ver una tendencia a ser menor en el plasma de las gestantes sEng+ comparadas con las WT, las diferencias no son estadísticamente significativas (FIGURA 44.B). Sin embargo, al analizar el ratio sFlt1:PlGF, observamos que éste es mayor en las gestantes sEng+ en relación con el ratio en las WT (FIGURA 44.C). Aunque algunos autores han observado el aumento de sFlt1 o el descenso de PlGF en preeclampsia, lo que en realmente se ha demostrado que actúa como biomarcador es el ratio sFlt1:PlGF (Levine et al, 2006).

Nuestros resultados indican que, en los animales con altas concentraciones de sEng no se modifican de manera significativa los niveles plasmáticos de sFLT1 ni la concentración de PlGF, sin embargo, el ratio sFlt1:PlGF si se encuentra aumentado.



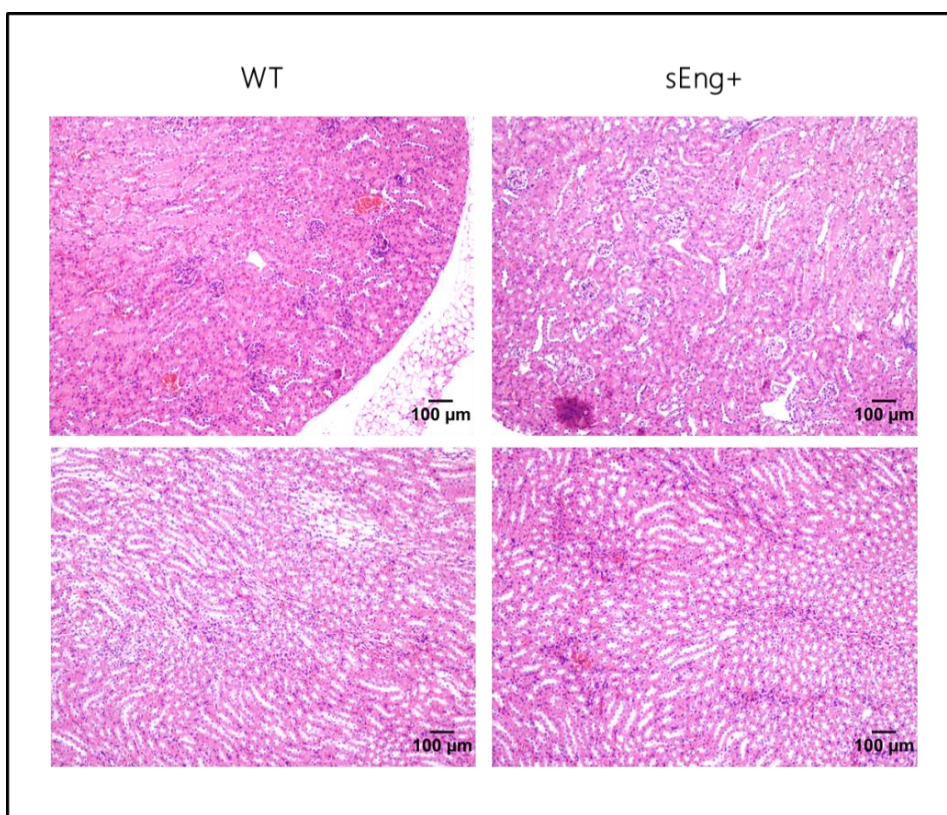
**FIGURA 44:**

Concentración de mFlt1 y mPLGF en plasma de gestantes sEng+ y WT

**A.** Concentración plasmática de mFlt1 en gestantes WT y sEng+ a día 13 y 18 de preñez. WT día 13 (N=10), sEng+ día 18 (N=9), WT día 18 (N=10), sEng+ día 18 (N=9). **B.** Concentración plasmática de PLGF en gestantes WT y sEng+ a día 13 y 18 de preñez. WT día 13 (N=10), sEng+ día 18 (N=9), WT día 18 (N=9), sEng+ día 18 (N=9). **C.** Ratio sFlt1:PLGF. WT día 13 (N=6), sEng+ día 18 (N=7), WT día 18 (N=9), sEng+ día 18 (N=8). Análisis estadístico t de student para datos paramétrico: \*p<0,05 vs WT. Cada barra representa la media ± EEM.

### 3.7. Alteraciones renales

Quisimos estudiar si el aumento de proteinuria observado en las gestantes sEng+ a día 18 de gestación puede ser debido a alteraciones renales, tal y como sucede en preeclampsia (Krane & Hamrahian, 2007). Para ello, teñimos con H&E riñones de gestantes WT y sEng+ extraídos a día 18. Tras la observación al microscopio, no detectamos alteraciones significativas en los riñones procedentes de las hembras sEng+ comparados con los de las WT (FIGURA 45).

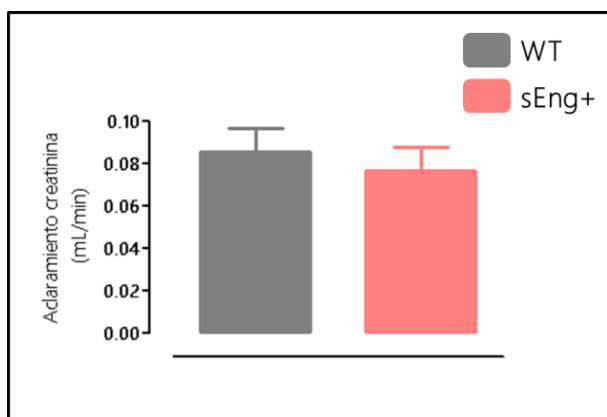


**FIGURA 45:** Tinción de H&E de riñones WT y sEng+ a día 18 de gestación

Imágenes representativas de la tinción de H&E correspondiente a riñones WT y sEng+ de día 18 de gestación. Micrografías obtenidas mediante cámara adosada a microscopio óptico con 100 aumentos



Por otro lado, medimos la tasa de filtración glomerular de las gestantes sEng+ comparándola con la de las gestantes WT a día 18 de preñez, No apreciamos diferencias entre ambas (FIGURA 46). Por ello, podemos deducir que el incremento de sEng en este modelo no se asocia con cambios en la filtración glomerular.



**FIGURA 46:** Tasa de filtración glomerular en gestantes WT y sEng+ a día 18

Medidas del aclaramiento de creatinina de las gestantes WT y sEng+ a día 18 de gestación. WT (n=7), sEng+ (n=9). Análisis estadístico t student para datos paramétricos. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

Por tanto, la proteinuria observada en el modelo sEng+ a día 18 de gestación no parece estar relacionada con alteraciones estructurales detectable con la tinción H&E del riñón, ni con alteraciones en la tasa de filtrado glomerular.

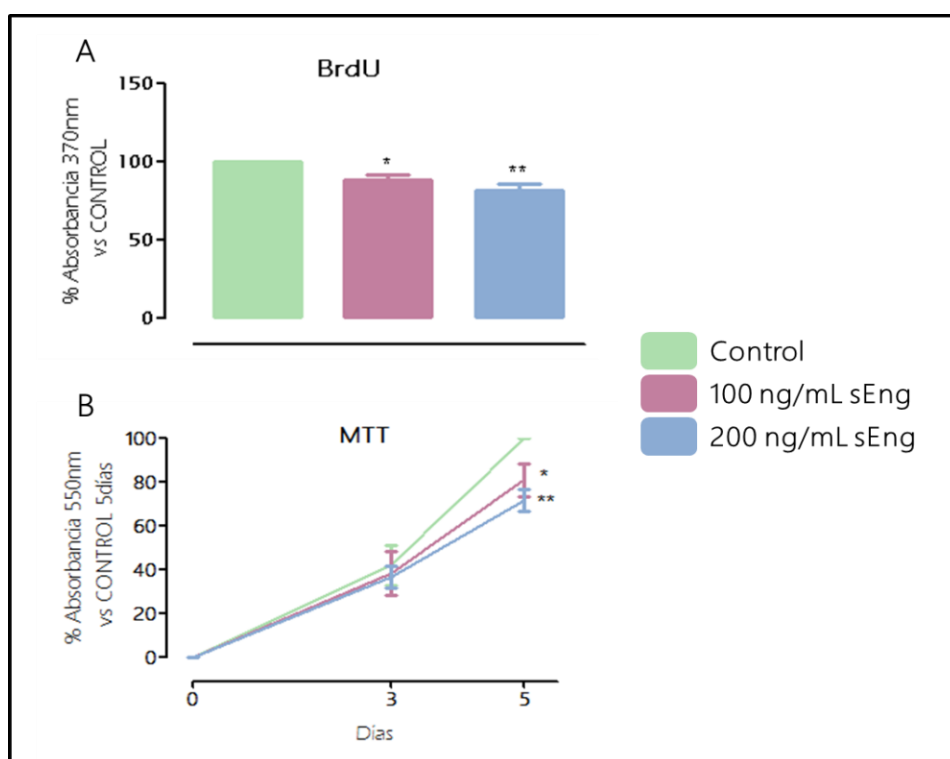
## *Estudios in vitro*

Para estudiar de forma más concreta el papel de sEng en el proceso de placentación, empleamos una línea celular procedente de coriocarcinoma humano (JAR), que tratamos con diferentes concentraciones de sEng: 100 ng/mL y 200 ng/mL.

### 1. Estudios de proliferación celular en trofoblastos

En primer lugar, estudiamos el efecto de sEng en la proliferación de las células trofoblásticas. Observamos, que la incorporación de BrdU fue menor en las células tratadas con sEng que en las no tratadas (FIGURA 47.A). Además, medimos la tasa de MTT reducido, viendo que ésta es significativamente menor al 5º día tras el tratamiento con sEng, que en las células control (FIGURA 47.B).

Tanto la medida de incorporación de BrdU, como la cantidad de MTT reducido, las podemos extrapolar a la tasa de proliferación y al número de células metabólicamente activas, respectivamente. Consecuentemente, tras la observación de estos resultados, podemos afirmar que sEng podría estar influyendo en el proceso de proliferación de las células trofoblásticas de la placenta, induciendo una reducción del mismo.



**FIGURA 47:** Proliferación de células JAr en cultivo

**A.** Tanto por ciento de incorporación de BrdU en células JAr tratadas con 100 y 200 ng/mL de sEng, respecto a la incorporación en células controles a las 2,5 horas. Análisis estadístico ANOVA de una vía: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs Control. **B.** Tanto por ciento de reducción de MTT a lo largo del tiempo en células JAr tratadas con 100 y 200 ng/mL de sEng con respecto a la reducción en las controles a los 5 días. Análisis estadístico ANOVA de doble vía: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs Control. Los resultados representan la media de 5 experimentos. Cada barra (A) o punto (B) representa la media  $\pm$  EEM.

## 2. Estudios de migración e invasión celular en trofoblastos

La migración es un proceso de motilidad celular en el que tiene lugar cambios en la polaridad y adhesión celular, mientras que el proceso de invasión implica otra serie de cambios estructurales y mecanismos celulares, como activación de

metaloproteinasas y cambios de moléculas de adhesión celular. Tanto la migración como la invasión de los trofoblastos, son procesos importantes para el correcto desarrollo placentario. Por ello, quisimos analizar el efecto de sEng sobre la capacidad migratoria e invasiva de las células JAr.

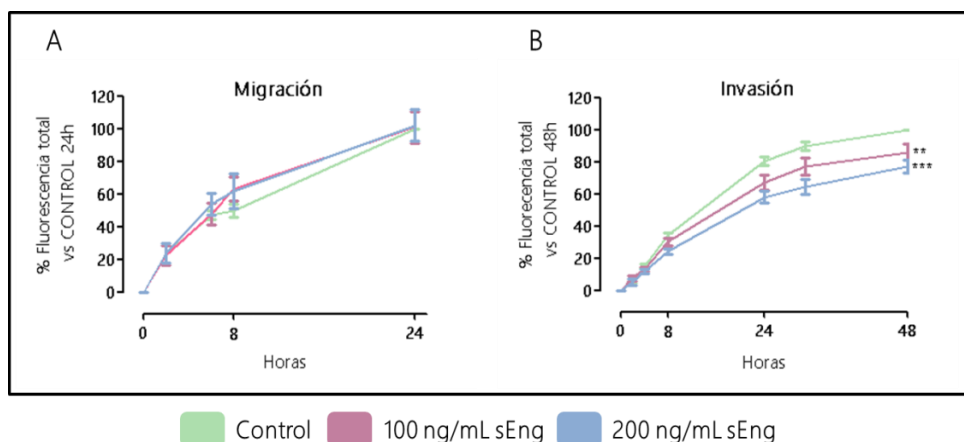
Sembramos células marcadas con calceína sobre una membrana de *transwell*, que, debido al gradiente de concentración de factores quimiotácticos presentes en el suero bovino fetal, generado a través de la membrana, las células tenderán a migrar a través del poro hacia el compartimento inferior. Medimos la capacidad migratoria de las células JAr tras el tratamiento con sEng en comparación con las controles, células sin tratamiento. Observamos que no existen diferencias en la capacidad migratoria entre las células tratadas con 100 y 200 ng/mL de sEng y las controles (FIGURA 48.A).

Del mismo modo, para comprobar el efecto de sEng sobre la capacidad invasora de los trofoblastos, sembramos las células sobre una capa de Matrigel®, la cual cubre la membrana del *transwel*. Las células, para pasar hacia el compartimento inferior atraídas por el gradiente de suero, deberán invadir y degradar la capa de Matrigel®, lo que supone la activación de procesos celulares distintos de los activados por el mero hecho de migrar a través del poro.

Al comparar la capacidad invasora de las células JAr comprobamos que, al tratarlas con concentraciones de 100 y 200 ng/mL de sEng, se induce una disminución de la invasión, en comparación con las controles (FIGURA 48.B).

Por tanto, tras el análisis de estos resultados, observamos que sEng no parece modificar la capacidad migratoria de las células trofoblásticas. Sin embargo, si induce una disminución de la invasividad de las mismas, lo cual es proceso clave

para el correcto remodelado de las arterias espirales, y que vemos alterado en preeclampsia.



**FIGURA 48:** Migración e invasión de células JAr en cultivo

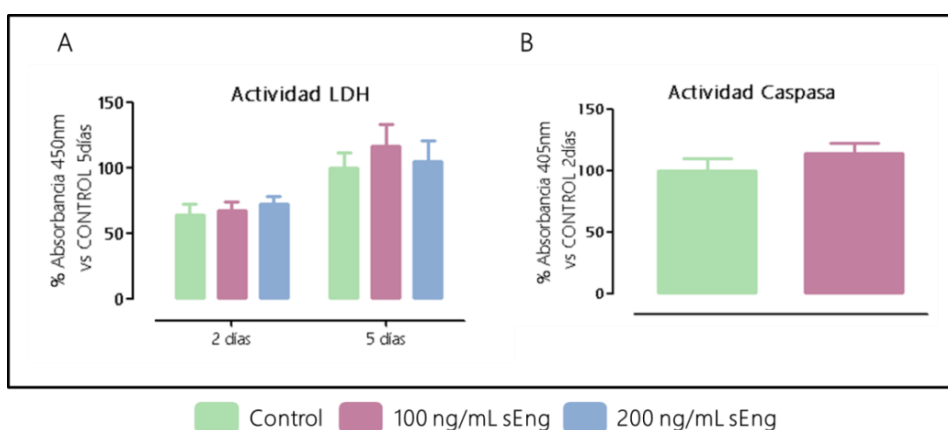
**A.** Tanto por ciento de células JAr tratadas con 100 y 200 ng/mL de sEng que migran a lo largo del tiempo, con respecto a las células controles que migran en 24h. **B.** Tanto por ciento de células JAr tratadas con 100 y 200 ng/mL de sEng que invaden a lo largo del tiempo, con respecto a las células controles que invaden en 24h. Análisis estadístico ANOVA de doble vía: \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs Control. Los resultados representan la media de 5 experimentos. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM.

### 3. Análisis de la muerte celular en trofoblastos

Para descartar que las alteraciones en los procesos evaluados anteriormente se deban a un aumento de la muerte celular, comprobamos el efecto de sEng sobre la necrosis y apoptosis de estas células. Por otro lado, como ya hemos comentado en la introducción de este trabajo, entre los diversos cambios patológicos que se dan en las placentas de mujeres con preeclampsia, se incluye la liberación de restos celulares a la circulación sistémica procedentes de la muerte de los sincitiotrofoblastos, los cuales, podrían estar también contribuyendo con las

alteraciones placentarias (Goswami et al, 2006; Knight et al, 1998; Redman et al, 2012).

Para evaluar el efecto de sEng en la necrosis celular, medimos la actividad de las enzimas LDH en el sobrenadante de células JAr tras 2 y 5 días de tratamiento con 100 y 200 ng/mL de sEng, comprándola con la actividad de esta enzima en el sobrenadante de las células sin tratar. Observamos que el tratamiento no modifica la actividad de la enzima, por lo que podemos deducir que sEng no induce necrosis celular (FIGURA 49.A).



**FIGURA 49:** Necrosis y apoptosis de células JAr en cultivo

**A.** Tanto por ciento de actividad de la enzima LDH a los 2 y 5 días de tratamiento, con 100 y 200 ng/mL de sEng, respecto a la actividad en las células controles. Análisis estadístico ANOVA de doble vía. Los resultados representan la media de 4 experimentos. **B.** Tanto por ciento de actividad de la enzima Caspasa a los 2 días de tratamiento, con 100 ng/mL de sEng, respecto a la actividad en las células controles. Análisis estadístico t student para datos paramétricos. Los resultados representan la media de 6 experimentos. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

A continuación, comprobamos si sEng promueve alteraciones en la apoptosis de los trofoblastos. Para ello, medimos la actividad de la enzima caspasa 3 en las células JAr, tras 48 horas de tratamiento con 100 y 200 ng/mL de sEng. Al analizar

los resultados, observamos que sEng no modifica la actividad de la enzima, y por tanto, deducimos que no hay alteración de la apoptosis celular, tras 48 horas de tratamiento (FIGURA 49.B).

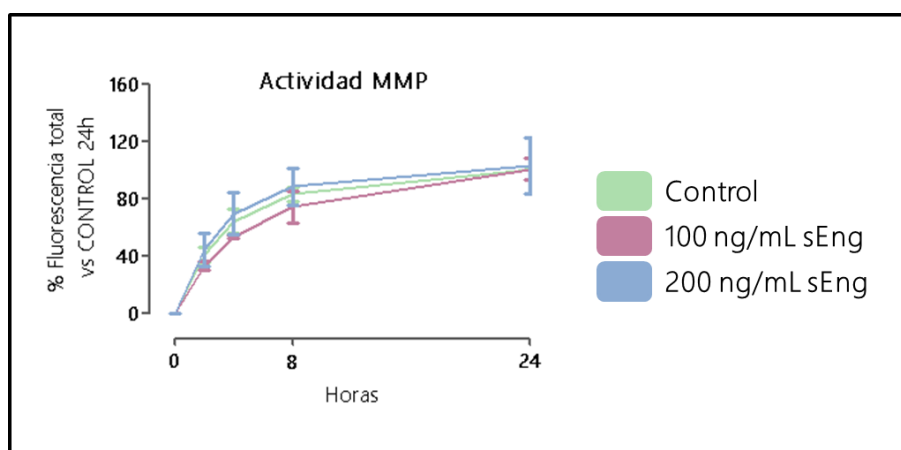
Concluimos, que sEng no aumenta los procesos de muerte celular en trofoblastos.

#### 4. Estudio de la actividad de las enzimas metaloproteinasas en trofoblastos

Una vez descartado el aumento de muerte celular inducido por sEng, quisimos estudiar qué proceso o procesos está modificando la sEng para dar lugar a una reducción en la capacidad invasora de las células trofoblásticas, ya que, como hemos comentado, es un proceso importante para la correcta placentación.

En primer lugar, analizamos si sEng reduce la actividad de las metaloproteinasas, enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular, y por tanto, esenciales para la invasión celular. Tratamos células JAr con concentraciones de 100 y 200 ng/mL de sEng y medimos la actividad de las enzimas metaloproteinasas en comparándola con las células controles. Observamos que sEng no modifica la actividad metaloproteinasas (FIGURA 50).

Por tanto, deducimos que la reducción de la capacidad invasora de las células JAr tras el tratamiento con sEng, no parece deberse a un defecto en la degradación de la matriz extracelular por las enzimas metaloproteinasas.



**FIGURA 50:** Actividad de metaloproteinasas en células JAr en cultivo

Tanto por ciento de actividad metaloproteásica en células JAr tratadas con 100 y 200 ng/mL de sEng, a lo largo del tiempo, con respecto a la actividad en células controles a las 24h. Análisis estadístico ANOVA de doble vía. Los resultados representan la media de 3 experimentos. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM.

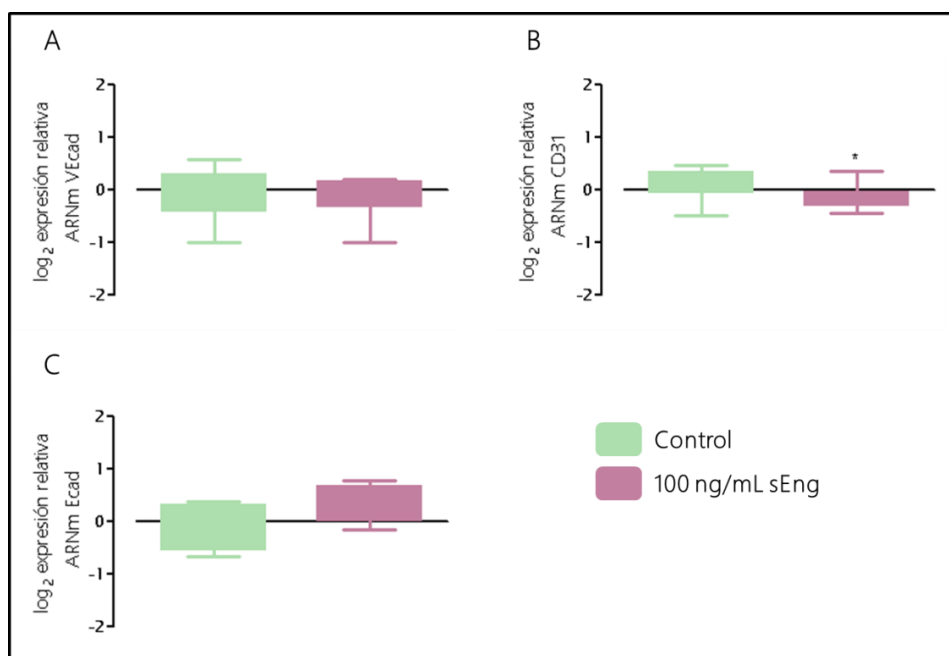
## 5. Proceso de “pseudo-vasculogénesis” en trofoblastos

En el proceso de cambio de fenotipo de los trofoblastos, de evCT a enCT, conocido como pseudo-vasculogénesis, se produce un cambio en las moléculas de adhesión intercelular. En un fenotipo más invasivo, como el de enCT, se induce la expresión de proteínas como CD31 y VEcadherinas, en detrimento de otras moléculas como Ecadherina. En preeclampsia este proceso está alterado, lo que da lugar a una invasión defectuosa por parte de los enCT (Fisher, 2004; Zhou et al, 1997a).

Quisimos estudiar si, la disminución de la capacidad invasora de las células JAr tras el tratamiento de sEng, se debe a una alteración en este cambio de fenotipo. Para ello, estudiamos, mediante qPCR, los niveles de expresión de ARNm de CD31, VEcadherina y Ecadherina, tras 24 horas de tratamiento con sEng. Como apenas



encontramos diferencias en invasión celular entre los resultados con 100 y 200 ng/mL de sEng, decidimos emplear, únicamente, la dosis más baja.



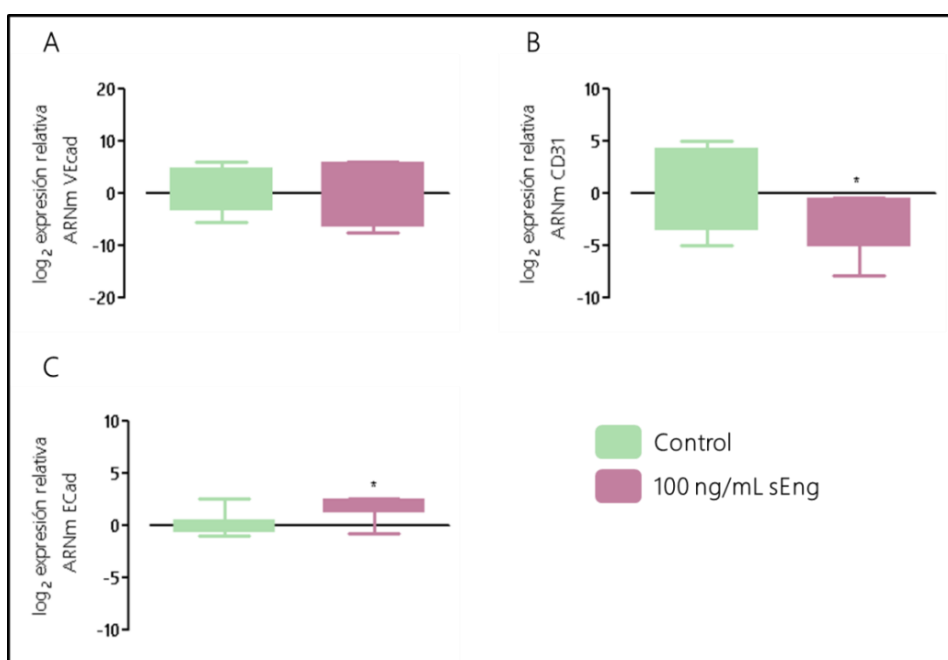
**FIGURA 51:**

**Efectos de sEng sobre la expresión de moléculas de adhesión en células JAr**

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *VEcad* (A), *CD31* (B), *Ecad* (C). Control (N=10), 100 ng/mL sEng (N=10). Análisis estadístico t de student para datos paramétrico: \*\*p<0,01. Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras control. Se representa un *box plot* 10-90 percentil.

Observamos, que en células JAr, tras el tratamiento con 100 ng/mL de sEng, la expresión relativa de *CD31* es menor que en las células controles (FIGURA 51.A). Sin embargo, no vemos diferencias en la expresión de *VEcad* (FIGURA 51.B) ni de *Ecad* (FIGURA 51.C), aunque en este último análisis vemos una tendencia a una mayor expresión en células tratadas con sEng.

Por otro lado, analizamos el efecto de sEng sobre la pseudo-vasculogenesis en explantes obtenidos de placentas de mujeres sin alteraciones patológicas en la gestación. Los explantes fueron tratados con 100 ng/mL de sEng durante 4h, tras lo cual, analizamos la expresión de *CD31*, *VEcad* y *Ecad* mediante qPCR. Observamos que sEng induce una disminución de *CD31*, así como un aumento en la expresión de *Ecad*. Sin embargo, no se aprecian cambios en la expresión de *VEcad* (FIGURA 52).



**FIGURA 52:**

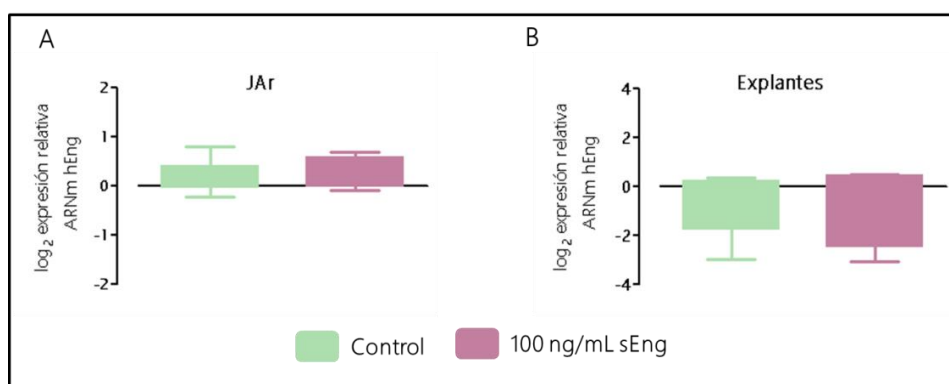
Efectos de sEng sobre la expresión de moléculas de adhesión en explantes placentarios

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *VEcad* (A), *CD31* (B), *Ecad* (C). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto a la muestra control. Control (N=9), 100 ng/mL sEng (N=8). Análisis estadístico t de student para datos paramétrico: \*\*p<0,01. Se representa un box plot 10-90 percentil.

Por tanto, a la vista de los resultados, podemos deducir que sEng disminuye la expresión de CD31, molécula de adhesión característica del fenotipo invasivo enCT, así como un aumento de la expresión de Ecad, característica del fenotipo evCT. Esta alteración en la expresión de moléculas de adhesión intercelular podría estar interfiriendo en el proceso de pseudo-vasculogénesis y, consecuentemente en el proceso de invasión celular.

## 6. Liberación de sEng en células trofoblásticas

En el modelo sEng+ se ha observado que el exceso de hsEng plasmática incrementa los niveles de sEng endógena. Sin embargo, vemos, mediante qPCR, que el tratamiento con sEng, tanto en células JAr como en explantes placentarios, no incrementa los niveles de ARNm de hEng (FIGURA 53).



**FIGURA 53:** Efecto de sEng sobre la expresión de hEng

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *hEng* en JAr (A) y explantes placentarios (B). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto a la muestra control. Control JAr (N=9), 100 ng/mL sEng JAr (N=10); Control explantes (N=8) 100 ng/mL sEng explantes (N=6). Análisis estadístico t de student para datos paramétrico. Se representa un *box plot* 10-90 percentil.

Debido a que, tanto las células JAr como los explantes placentarios, son de origen humano, al igual que la sEng que empleamos para el tratamiento (rhEng), no pudimos medir la concentración de sEng en el sobrenadante, ya que no podríamos distinguirlas.

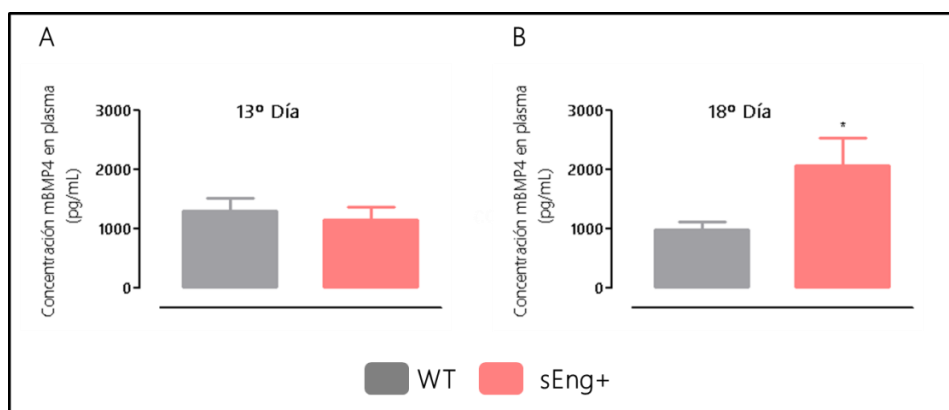
## Endoglina soluble y BMP4

La proteína morfogenica ósea, BMP4, descrita como un ligando de Eng, es una citocina de la familia de TGF $\beta$  que actúa sobre la diferenciación, regulación y regeneración ósea (Wu et al, 2016), la hematopoyesis (Borges et al, 2013) y sobre la regulación de la presión arterial (Frank et al, 2005; Miriyala et al, 2006; Wang et al, 2015).

Experimentos previos, realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Carmelo Bernabeu del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de Madrid, mostraron que sEng aumenta los niveles de BMP4 en células endoteliales. Esto se observó mediante un análisis proteómico cuantitativo, espectrometría de masas y experimentos adicionales *in vitro* e *in vivo*. Para los experimentos *in vitro*, se trataron células endoteliales HUVECs con concentraciones crecientes de sEng, y se observó un aumento de los niveles de BMP4, tanto a nivel proteico como de ARNm, según se incrementaba la concentración de sEng. Además, los ratones transgénicos *sol.eng+*, expresaron mayores niveles de ARNm de BMP4 en diferentes tejidos, en comparación con los niveles expresados por los ratones controles. Asimismo, estos ratones tenían una mayor concentración de BMP4 en plasma. Estos resultados sugieren que BMP4 podría ser una proteína importante en la activación de rutas de

señalización inducidas por sEng, las cuales podrían participar en la regulación de los procesos de hipertensión.

Debido a estos antecedentes, nos planteamos estudiar los niveles de BMP4 en nuestro modelo animal de preeclampsia, sEng+. Medimos los niveles de BMP4 en plasma a día 13 y 18 de gestación mediante el empleo de un kit comercial de ELISA. Los resultados expuestos en la figura 54, nos muestra que no hay diferencias en la concentración de BMP4 a día 13 de gestación en el plasma de las gestantes WT y sEng+, mientras que a día 18 de preñez, observamos un aumento en los niveles de BMP4 en el plasma de las hembras sEng+ en comparación con el de las WT (FIGURA 54).

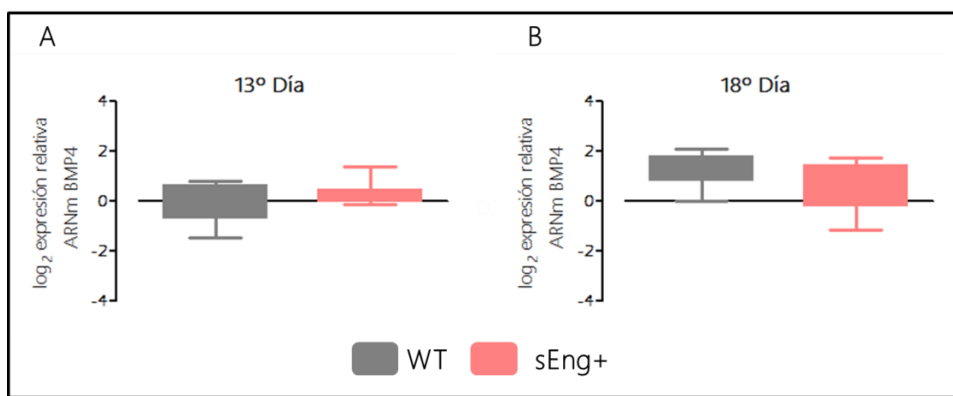


**FIGURA 54:** Concentración plasmática de BMP4 en gestantes WT y sEng+

**A.** Concentración plasmática de BMP4 en gestantes WT y sEng+ a día 13 de preñez. WT (N=7), sEng+ (N=5). **B** Concentración plasmática de BMP4 en gestantes WT y sEng+ a día 18 de preñez. WT (N=9), sEng+ (N=9). Análisis estadístico t de student para datos paramétrico: \* $p < 0,05$  vs WT. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

Observamos que los altos niveles de sEng se asocian a un aumento de BMP4 en plasma en un modelo animal de preeclampsia.

Quisimos comprobar si la placenta, y por tanto, las células trofoblásticas, estaban contribuyendo al aumento en la concentración de BMP4 en plasma. Para ello, en primer lugar, medimos la expresión del ARNm de BMP4 en las placentas de las gestantes sEng+ comparándola con la expresión en las WT. Observamos que no existen diferencias significativas, ni a día 13 ni 18 de gestación, entre las placentas sEng+ y WT (FIGURA 55).



**FIGURA 55:** Expresión de BMP4 en placentas de gestantes WT y sEng+

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de BMP4 en las placentas a día 13 (A) y 18 (B) de gestación procedentes de WT y sEng+. Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto a la muestra WT. WT día 13 (N=11), sEng+ día 13 (N=8), WT día 18 (N=10), sEng+ (N=13). Análisis estadístico t de student para datos paramétrico. Se representa un *box plot* 10-90 percentil.

A continuación, medimos, mediante el empleo de un kit de ELISA, la concentración de BMP4 en el sobrenadante, tanto de células JAr como de explantes placentarios tratados con 100 ng/mL de sEng durante 48h, en el caso de las células, y 24h, en el caso de los explantes. Sin embargo, en ninguno de los dos casos llegamos a detectar niveles de BMP4 apreciables mediante ELISA, siendo la concentración de 0 ó cercana a la misma (datos no mostrados).

Por tanto, basándonos en estos últimos resultados, podemos deducir que ni la placenta, ni por tanto los trofoblastos, contribuyen al aumento de BMP4 detectado en el plasma de las gestantes sEng+ al final de la preñez.





---

# DISCUSIÓN

---

*"Por fin amaneció. Avanzó la aurora como una flor de fuego y retrocedió lentamente la oscuridad. El cielo se aclaró y la abrumadora belleza del paisaje surgió ante sus ojos como un mundo recién nacido".*

*De amor y sombras. Isabel Allende*



Diversos estudios han demostrado un aumento de diferentes receptores solubles en el plasma de mujeres con preeclampsia, entre los que podemos destacar la endoglina soluble. Hasta la fecha, sEng se ha considerado un biomarcador, tanto de diagnóstico, debido a su aumento antes de la aparición de los síntomas clínicos, como de pronóstico, ya que se ha correlacionado con un peor pronóstico de la enfermedad (Levine et al, 2006; Maynard et al, 2010; Venkatesha et al, 2006).

En el estudio realizado por el grupo de Karumanchi, observaron que ratas gestantes, a las que se les inyectó un adenovirus que induce la sobre-expresión de sEng, presentaban un aumento de presión arterial. Además, observaron alteraciones renales, como endoteliosis, y mayor inflamación celular en la zona de contacto entre la parte materna y fetal de la placenta. Apoyándose, además, en experimentos realizados *in vitro*, afirmaron que sEng, junto con sFlt1, induce un agravamiento de la sintomatología de la preeclampsia (Venkatesha et al, 2006). Este estudio, abrió las bases sobre las que planteamos la hipótesis central de este trabajo: sEng tiene un papel principal en preeclampsia, siendo, al menos en parte, responsable de la sintomatología, así como otras alteraciones características de esta enfermedad. Por tanto, sEng no sólo actuaría como biomarcador de preeclampsia para un mejor pronóstico y diagnóstico, sino que podría ser una diana terapéutica para la mejora tanto de los síntomas clínicos como de las causas que precipitan la enfermedad.

En nuestro laboratorio en colaboración con el Dr Carmelo Bernabeu (CIB, CSIC; Madrid), produjimos una línea de ratones transgénicos (*sol.eng+*), que sobre-expresan sEng humana, y presentan altos niveles plasmáticos de la misma (Valbuena-Diez et al, 2012). Hemos observado que dichos ratones, al igual que ocurría en el modelo animal del estudio de Karumanchi (Venkatesha et al, 2006),

presentan los síntomas clínicos característicos de preeclampsia: hipertensión y proteinuria, además de alteraciones renales y reducción del tamaño fetal. En base a estos resultados, confirmamos que, en nuestro modelo de ratones transgénicos, la sobre-expresión de hsEng se asocia con síntomas característicos de preeclampsia.

Como ya comentamos en el apartado de *Introducción*, la principal crítica de los modelos animales de esta enfermedad, es que la mayoría de ellos son independientes del estado de gestación, y la placenta no interviene en el desarrollo de la sintomatología clínica. Estos modelos animales, tanto el de Karumanchi como nuestro modelo de ratón transgénico, únicamente son representativos de lo que se ha denominado, la segunda etapa de la enfermedad, que englobaría la respuesta sistémica materna y los síntomas clínicos (Roberts & Hubel, 2009). En el modelo *sol.eng+*, observamos que dichos síntomas clínicos están presentes en todos los animales del estudio, machos y hembras, gestantes y no gestantes, y que además el estado de preñez no agrava esta sintomatología. Por ello, en base a lo descrito, obtuvimos la conclusión de que ése no era un modelo animal de preeclampsia adecuado.

Para cumplir nuestro objetivo de estudio, nos planteamos la obtención de un modelo animal de la enfermedad que represente de forma más fisiopatológica lo que sucede en preeclampsia, donde, además de estar representada la sintomatología a nivel sistémico materno, esta venga originada por el estado de gestación y donde la placenta tenga un papel protagonista, tal y como ocurre en preeclampsia.

## Modelo animal de preeclampsia “sEng+”

Para el mantenimiento de la línea de los ratones transgénicos, *sol.eng+*, antes mencionados, realizamos cruces entre machos *sol.eng+* con hembras *wild type* (WT). En estos cruces, observamos que tanto el número total de fetos en cada camada, como el peso de los mismos, estaban reducidos, a pesar de que la hembra no tenía ninguna alteración previa que pueda estar condicionando el estado de preñez. Revisando la bibliografía encontramos un modelo de preeclampsia con ratones transgénicos obtenidos a partir de este tipo de cruces, machos transgénicos y hembras WT (Doridot et al, 2013). Basándonos en estas observaciones, nos planteamos que las gestantes WT, cruzadas con machos *sol.eng+*, podría ser un buen modelo de preeclampsia para estudiar el efecto de sEng.

En primer lugar, observamos que las hembras gestantes resultantes del cruce con los machos transgénicos (gestantes sEng+), muestran un incremento en la concentración plasmática de sEng humana a partir de la segunda mitad de la gestación, observando un aumento progresivo de los mismos.

Por tanto, afirmamos que nuestro modelo de preeclampsia sEng+, no solo presenta una alta concentración de hsEng en plasma, sino que ésta aumenta de forma progresiva a medida que avanza el estado de gestación, tal y como ocurre en esta enfermedad.

Sin embargo, cabe mencionar, el pequeño descenso de los niveles de hsEng observados en al final de la gestación. Esto puede deberse a que en esta etapa la tasa de aborto es alta, y por tanto, muchos de los fetos y sus respectivas placentas, dejan de ser funcionales, se necrosan, por lo que dejan de contribuir con el aporte de sEng a la circulación materna. Sin embargo, no pudimos comprobar, si

efectivamente, estos abortos expresaban altos niveles de sEng, ya que al encontrarse necrosados tanto las placentas como los fetos, no pudimos obtener ARN ni en la cantidad ni calidad suficiente. No obstante, a pesar del descenso en la concentración de hsEng en la fase final de la gestación, estos niveles seguirán siendo muy elevados comparados con los niveles plasmáticos de sEng durante una gestación normal.

En cuanto al origen de hsEng en las gestantes sEng+, podría proceder directamente de la circulación fetal, en el caso de que hsEng atravesara la barrera materno-fetal. Otra posibilidad es que, ya que hsEng se expresa de forma ubicua en todas las células del organismo, la presencia de hsEng en el plasma materno proceda de los trofoblastos de las placentas pertenecientes a los fetos *sol.eng+*, que la liberan directamente al plasma materno con el que están en contacto.

## 1. Síntomas clínicos: hipertensión, proteinuria y reducción del crecimiento fetal.

Para confirmar que nuestro modelo de preeclampsia representa lo que ocurre en la patología humana, comprobamos si las gestantes sEng+ presentan los principales síntomas clínicos: hipertensión, proteinuria y reducción del crecimiento fetal. En nuestro modelo, observamos un incremento, tanto de la presión arterial sistólica, como de la tasa de excreción de proteínas en la orina, en comparación con las gestantes WT, en la última etapa de la gestación. En cuanto al crecimiento fetal, apreciamos que es menor en las gestantes sEng+ que en las WT.

A pesar de observar un incremento en los niveles de hsEng a partir de segunda mitad de la gestación, no es hasta el final de la misma, cuando la presión sistólica de

las gestantes sEng+ aumenta en comparación con las gestantes WT. Lo mismo ocurre con los niveles de proteinuria, ya que hasta la última etapa de la gestación no se detecta un incremento en la excreción de proteínas en la orina. Esto nos indica que el efecto de sEng sobre los síntomas clínicos no ocurre de forma directa e inmediata. Por tanto, al igual que sucede en preeclampsia, en nuestro modelo animal, los niveles de sEng plasmáticos se encuentran elevados antes de la aparición de los síntomas clínicos (Levine et al, 2006; Maynard et al, 2010), manteniendo su función como marcador predictivo de la enfermedad. Sin embargo, en nuestro caso, no hemos podido obtener una clara correlación entre los niveles de sEng y un peor pronóstico y gravedad de los síntomas, que sí han mostrado otros autores (Levine et al, 2006; Venkatesha et al, 2006). Esto puede deberse a que los niveles de hsEng en este modelo, están muy por encima de los niveles encontrados en mujeres con preeclampsia. De esta forma, el mecanismo de acción de sEng podría estar saturado, llegando a su máximo de actuación. Por otro lado, para poder obtener resultados de correlación significativos, es necesario un número muestral mucho más elevado del que hemos empleado, algo incompatible con los criterios de bioética que se deben respetar en la experimentación con animales.

En cuanto al estudio de la reducción del crecimiento fetal, comparamos el peso de todos los fetos de la camada en conjunto, ya que, como comentamos en el apartado de *Resultados*, los roedores tienen la capacidad de poder redistribuir el aporte sanguíneo hacia los fetos según su demanda y el flujo disponible, de forma que, en condiciones de pobre aporte sanguíneo o nutritivo, se disminuye el número de fetos viables, manteniendo, en lo posible, a los supervivientes en las mejores condiciones posible. En humanos esto no ocurre, por lo que observamos en este caso, una reducción del crecimiento fetal.

En nuestro modelo, además, encontramos una mayor tasa de aborto en las gestantes sEng+ comparada con las WT, en la fase final de la preñez. La mayor tasa de crecimiento fetal tiene lugar en esta etapa final, ya que no es hasta el último periodo cuando la circulación materno-fetal se hace efectiva, y por tanto, aporta una mayor cantidad de nutrientes al feto. En humanos, esto tiene lugar a partir de la 12ª semana de gestación (Jauniaux et al, 1995; Jauniaux et al, 2000), mientras que en ratones, la circulación efectiva se establece a partir del 12,5 día de preñez (Muntener & Hsu, 1977). Por ello, en nuestro modelo animal las mayores diferencias, tanto en la masa fetal como en el porcentaje de abortos, la observamos en la gestación a término.

## 2. Alteraciones placentarias

### 2.1. Alteración del remodelado y flujo sanguíneo

Una vez comprobado que el aumento de expresión de sEng en hembras preñadas se asocia al desarrollo de la sintomatología típica de preeclampsia, nos centramos en estudiar el efecto que tiene sEng en el desarrollo del resto de alteraciones, características de la enfermedad.

En primer lugar, analizamos las consecuencias del aumento de sEng sobre el correcto desarrollo y función placentaria, ya que la preeclampsia ha sido relacionada con defectos en estos procesos (De Maria & See, 1966; Roberts & Escudero, 2012). En concreto, la aparición de la preeclampsia se ha asociado a un remodelado de las arterias espirales defectuosa o inexistente, de tal manera que estas arterias se mantienen como vasos de baja capacitancia, viéndose reducido el aporte sanguíneo



de la madre hacia la circulación placentaria (Brosens et al, 1967; Burton et al, 2009; Pijnenborg et al, 2006).

El remodelado arterial tiene lugar cuando los trofoblastos de tipo evCT, que se encuentran rodeando las arterias espirales, penetran hacia el interior del vaso integrándose en la pared del mismo, sustituyendo, temporalmente, a las células del endotelio y generando arterias de menor resistencia y, consecuentemente, con mayor flujo (Brosens et al, 1967; Burton et al, 2009; Pijnenborg et al, 2006). Por tanto, modificaciones en las funciones de los trofoblastos repercuten en este proceso y como consecuencia en un correcto desarrollo placentario.

Existen escasos estudios relacionados con el efecto de sEng en el proceso de placentación. Además, se observan controversias a la hora de definir el papel que ejerce, tanto sEng como Eng, en las funciones básicas de los trofoblastos. En muchos casos, esta controversia puede ser debida al uso de diferentes metodologías, así como al uso diferentes líneas celulares (Caniggia et al, 1999; Caniggia et al, 1997; Dong et al, 2011; Mano et al, 2011; Nakashima et al, 2013).

En este trabajo, los resultados *in vitro* demuestran que sEng reduce la proliferación e invasión de las células trofoblásticas.

En roedores, el proceso de remodelado arterial presenta diferencias con respecto al de humanos, ya que, en estos animales los trofoblastos presentan una invasión más superficial, no se produce la sustitución endovascular, por lo que el remodelado de las arterias espirales no es tan dependiente de la capacidad invasora de los trofoblastos, como ocurre en humanos, si no que depende de otros procesos y otras células relacionadas con el sistema inmune, como las células NK (Carter, 2007).

En las placentas de ratones existen unas células denominadas células de glucógeno, GCs. Estas células, como ya indicamos en el apartado de *Introducción*, aparecen en la zona basal de la placenta formando acúmulos. Esto irán incrementando su número hasta la mitad de la gestación, donde alcanzan su máximo, y viéndose muy reducidos hacia el final de la misma (Adamson et al, 2002; Coan et al, 2006; Coan et al, 2004; Waddell et al, 2000). La disminución en estos acúmulos se ha asociado con la invasión de las GCs hacia la decidua materna. En semejanza con los evCT de humanos, las GCs tienen capacidad invasiva, penetran por la decidua rodeando las arterias espirales. Sin embargo, estas células, a diferencia de los evCT, no penetran hacia el interior del vaso (Carter, 2007; Coan et al, 2006; Lefebvre, 2012).

Alteraciones que afectan al estado de gestación, como una dieta deficiente en nutrientes y aumento de hipoxia, favorecen el mantenimiento de células GCs en la zona basal hasta final de la gestación (Akison et al, 2017). En nuestro modelo, al analizar las placentas a término procedentes de las gestantes sEng+, observamos grandes áreas ocupadas por CGs que no detectamos en las placentas de WT. La presencia de estos acúmulos al final de la gestación en las hembras sEng+, podría estar relacionado con la disminución en la invasión observada *in vitro*, inducida sEng. Por tanto, podemos sugerir, que en nuestro modelo, los altos niveles plasmáticos de sEng, afectan a la capacidad invasora de las células, reduciendo la invasión de las CGs hacia la decidua materna.

Como ya hemos comentado, en preeclampsia, alteraciones en el remodelado arterial por defectos en el proceso de invasión trofoblástica, da lugar a una reducción del flujo hacia la placenta, y en consecuencia la aparición de hipoxia placentaria (Brosens, 1964; Browne & Veall, 1953). Por tanto, debido a la existencia

de defectos en la invasión observados en células trofoblásticas tras la administración de sEng, comprobamos si el flujo sanguíneo placentario también estaba afectado

En preeclampsia, la medición de flujo sanguíneo mediante la técnica de *Eco Doppler* del área materna (arteria uterina), placentaria (arteria umbilical) y fetal (arteria cerebral media y otros), constituye actualmente, un parámetro más de evaluación de las pacientes con esta enfermedad (Ghi et al, 2009; Meler et al, 2010b).

Sin embargo, en nuestro modelo de preeclampsia no encontramos diferencia, ni en las medidas correspondientes al flujo uterino, ni en las correspondientes al flujo fetal y placentario. Esto podría deberse, en parte, a la falta de sensibilidad de la técnica empleada por el pequeño tamaño del órgano a estudiar y la variabilidad a la que está sujeta: acondicionamiento de la sala, luz, temperatura, grado de anestesia del ratón, etc. Cabe destacar, que en la práctica clínica, además de una mayor sensibilidad y eficacia de los aparatos utilizados, miden varios parámetros y tienen en cuenta otra serie de variables a la hora de calcular el flujo uterino por esta técnica. En nuestro caso, estos condicionantes hacen que las posibles diferencias en el flujo queden enmascaradas, observando, únicamente, estas variaciones en condiciones en las que los cambios de flujo son muy evidentes y drásticos, como en los experimentos de isquemia-reperfusión, donde esta técnica ha sido más empleada (Jerkic et al, 2006; Limbourg et al, 2009).

Para continuar analizando el aporte de flujo hacia la placenta, y ya que con la técnica del Láser Doppler no pudimos extraer conclusiones claras, analizamos la expresión de HIF-1 $\alpha$  en las placentas de nuestro modelo. Encontramos un aumento notable de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en el núcleo de las células GCs, que no

observamos en el resto de trofoblastos colindantes, lo que sugiere una situación de hipoxia de estas células.

Estos resultados nos llevan a la siguiente hipótesis: Debido a que el resto de células presentan un estado de normoxia, podemos deducir que no se trata de una gran reducción en el aporte sanguíneo, lo que afectaría a toda la zona, sino que puede deberse a cambios de flujo más sutiles. Estas modificaciones, estarían afectando de manera más pronunciada a las células GCs, ya que tienen un mayor requerimiento de oxígeno al ser metabólicamente más activas en comparación con el resto de células trofoblásticas.

Recapitulando todo lo anteriormente expuesto, podemos concluir que el aumento de la expresión de sEng reduce la capacidad invasora de los trofoblastos, lo cual vemos reflejado en los experimentos in vitro, así como en el mantenimiento de las GCs en la zona basal de la placenta al final de la gestación. Debido a que la remodelación de las arterias espirales en roedores, no es tan dependiente de la invasión celular, no apreciamos una clara reducción del flujo sanguíneo hacia la placenta. Sin embargo, si podemos detectar un aumento de expresión de HIF-1 $\alpha$  en las células GCs, las cuales son metabólicamente más activas.

## **2.2. Alteraciones en la acumulación de glucógeno placentario**

Durante un embarazo normal, en el primer trimestre de gestación, aparecen acúmulos de glucógeno los cuales desaparecen hacia el final de la misma (Hahn et al, 2001; Shafrir & Barash, 1991). Esto se evaluó mediante técnicas inmunohistoquímica para la detección específica de glucógeno en los citotrofoblastos de las vellosidades coriónicas, que fue mayor en placentas de las primeras etapas y se perdía gradualmente según avanzaba la gestación (Jones et al,

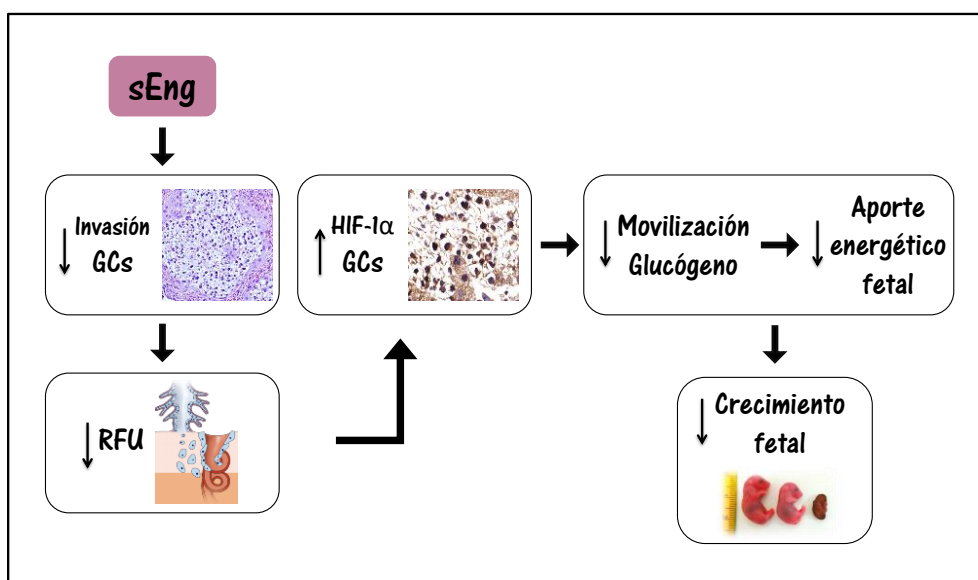
2016). En roedores, de forma análoga a lo que sucede en humanos, en la zona basal placenta observamos una disminución, hacia el final de la preñez, de las GCs, que presentan grandes acúmulos de glucógeno. Esta disminución, como ya hemos comentado, se ha asociado a una invasión de las GCs hacia la decidua materna, sin embargo también se ha relacionado con la movilización de estos azúcares. Se cree, que además de intervenir en el remodelado arterial, una de las posibles funciones de las GCs es la de servir de aporte de energía para el feto al final de la gestación (Akison et al, 2017).

Se ha observado que placentas procedentes de mujeres con preeclampsia, presentan un aumento en el contenido de glucógeno así como una menor actividad de la enzima glucógeno sintasa kinasa (GSK) en comparación con placentas de mujeres sanas (Arkwright et al, 1993). El alto contenido de acúmulos de glucógeno en estas placentas, presentes sobre todo en sincitiotrofoblastos (ST), ha sido relacionado con un fenotipo inmaduro u/o maligno de estas células (Rousset et al, 1981), ya que los ST de las primeras etapas de gestación, así como los trofoblastos de las molas hialiformes y de coriocarcinomas, presentan grandes cantidades de glucógeno (Huang et al, 1978; Maeyama et al, 1977; Robb & Hytten, 1976). Además, el aumento de estos acúmulos, también ha sido asociado con una disminución del crecimiento fetal, debido a alteraciones en la movilización de estas reservas (Akison et al, 2017).

Existen diversos estudios que han demostrado que HIF-1 $\alpha$  contribuye al acúmulo de glucógeno mediante la activación de la enzima glucógeno sintasa, además de reducir la degradación mediante la inhibición de la glucógeno fosforilasa. (Pelletier et al, 2012; Pescador et al, 2010; Vigoda et al, 2003).

Apoyándonos en estos estudios, podemos hipotetizar que el aumento de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en las células GCs en placentas procedentes de gestantes sEng+, podría estar inhibiendo la movilización de las reservas de glucógeno, presentes en estas células. Por tanto, podemos deducir que la reducción en el crecimiento fetal, observado en nuestro modelo, podría ser debido a una menor movilización del glucógeno, y por tanto, un menor aporte energético al feto en la última etapa de gestación.

Enlazando con las hipótesis expuestas en este apartado, podemos sintetizar el efecto del aumento de sEng en nuestro modelo animal con el siguiente esquema:



**FIGURA 56:** Efecto de sEng en placentas de gestantes sEng+

Endoglina soluble reduce la invasión de las GCs e interfiere en el remodelado de las arterias espirales, lo que da lugar a una leve reducción del flujo uterino (RFU). La disminución del RFU deriva en una disminución del aporte de oxígeno que afecta a las GCs, células metabólicamente más activas, lo que da lugar a un aumento de HIF1- $\alpha$ . Este aumento inhibe la movilización de las reservas de glucógeno y por tanto, del aporte energético al feto, que resulta en una reducción del crecimiento fetal.

### 3. Alteración en la concentración de receptores solubles en plasma.

En un embarazo normal, se ha descrito un aumento de los niveles plasmáticos de sEng y sFlt1 a medida que se avanza la gestación (Venkatesha et al, 2006). Sin embargo, en preeclampsia este aumento es mucho mayor, además de ir acompañado de una disminución de los niveles de PlGF (Levine et al, 2006; Levine et al, 2004; Lopez-Novoa, 2007; Maynard et al, 2003; Polliotti et al, 2003; Taylor et al, 2003; Venkatesha et al, 2006).

En nuestro modelo animal observamos un aumento en los niveles plasmáticos de sEng endógena y sFlt1 a medida que avanza la gestación, al igual que ocurre en un embarazo normal. Sin embargo, el incremento en la concentración plasmática de sEng endógena es mayor en las gestantes sEng+ que en las WT.

En cuanto al aumento en los niveles de sFlt1 y a la disminución de PlGF, no observamos diferencias significativas entre sEng+ y WT. Se ha demostrado que estos niveles no son buenos biomarcadores tempranos de la enfermedad (Levine et al, 2006). PlGF es un miembro de la familia de VEGF implicado en la angiogénesis y vasculogénesis durante la embriogénesis, ya que la principal fuente de liberación de este factor son las células trofoblásticas (Brennan et al, 2014; Marzioni et al, 2005). PlGF, al igual que VEGF, son ligandos del receptor de membrana Flt1, a través del cual transmite su señal al interior celular. Se cree, que niveles elevados de sFlt1 antagonizan la unión de estos ligandos a su receptor, reduciendo la transmisión de la señal al interior celular (Levine et al, 2004; Maynard et al, 2003). Por esta razón, el cociente entre el ligando, PlGF, y su antagonista, sFlt1, sFlt1:PlGF, es el mejor indicador de la función fisiológica de esta citocina (Levine et al, 2006). En nuestro caso, si observamos que este ratio es más elevado en las gestantes sEng+ en comparación con las WT.

En diferentes modelos animales de preeclampsia se ha descrito un incremento en los niveles de sEng. Esto ocurre, por ejemplo, en el modelo de reducción de la presión de perfusión uterina, RUPP (Gilbert et al, 2009), en el modelo de ratón transgénico STOX1 (Doridot et al, 2013), o tras la administración de AA-AT1 a ratas preñadas (LaMarca et al, 2012). Además, en diversos estudios *in vitro* también se ha observado un incremento en la liberación de sEng por parte de trofoblastos al ser sometidos a condiciones de hipoxia, estrés oxidativo o inflamación (Cudmore et al, 2007; Valbuena-Diez et al, 2012; Yinon et al, 2008). Por tanto, alteraciones similares a las que ocurren en preeclampsia favorecen el aumento de sEng.

En nuestro caso, podemos sugerir, que los altos niveles de sEng en plasma dan lugar a la aparición de alteraciones placentarias, estrés oxidativo, inflamación, etc., que pueden participar en la sintomatología de la preeclampsia, y que a su vez, promueve un aumento de sEng endógena al plasma. Por tanto, se podría estar produciendo una retroalimentación positiva que daría lugar a un agravamiento de los síntomas clínicos y a un peor pronóstico.

También quisimos estudiar *in vitro* si el tratamiento con sEng induce de forma directa un aumento en la liberación sEng. Sin embargo, esto no lo pudimos comprobar en nuestros modelos *in vitro*, ya que, tanto las células JAr como los explantes placentarios, son de origen humano, al igual que la sEng con la que los tratamos, y por tanto no podríamos distinguir cual es la sEng procedente de las células, y cual la correspondiente al tratamiento. No obstante, medimos los niveles de expresión de *hEng* mediante qPCR y comprobamos que el tratamiento con sEng no modifica estos niveles. Además, observamos que este tratamiento tampoco se asocia con cambios en la actividad de las metaloproteinasas. Por tanto, ya que parece que la sEng procede del corte proteolítico de la Eng de membrana



(Hawinkels et al, 2010) y, ni la expresión de Eng, ni la actividad metaloproteinásica, parecen estar modificadas tras el tratamiento con sEng, deducimos que el aumento de sEng endógena en las gestantes sEng+ no es un efecto directo de sEng sobre los trofoblastos, sino que es consecuencia secundaria de las alteraciones generadas en este modelo.

#### 4. Aumento de estrés oxidativo e inflamación

Durante el embarazo se produce un aumento de estrés oxidativo e inflamación, los cuales son todavía mayores en preeclampsia, donde se han descrito niveles elevados de especies reactivas de oxígeno, ROS (Burton & Jauniaux, 2011; Redman & Sargent, 2009), así como un aumento de factores pro-inflamatorios, los cuales pueden contribuir a diversas alteraciones observadas en esta enfermedad (Redman et al, 1999; Redman & Sargent, 2003).

En nuestro modelo, observamos un aumento de peroxidación lipídica en placenta, de forma más temprana en las gestantes sEng+ que en las WT. Además, en estas placentas vemos un incremento en los niveles de expresión de citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL- $\beta$ , antes de la aparición de los síntomas clínicos. Deducimos por tanto, que las altas concentraciones plasmáticas de sEng contribuyen al aumento de estrés oxidativo e inflamación.

Sin embargo, como hemos mencionado en el apartado de *Introducción*, existen controversias en el efecto que sEng puede ejercer sobre la respuesta inflamatoria. Por un lado, se ha demostrado que sEng induce la liberación de citocinas inflamatorias a través del aumento NF $\kappa$ B en células endoteliales (Varejckova et al, 2017). En cambio, por otro lado, sEng se ha asociado con una reducción del proceso

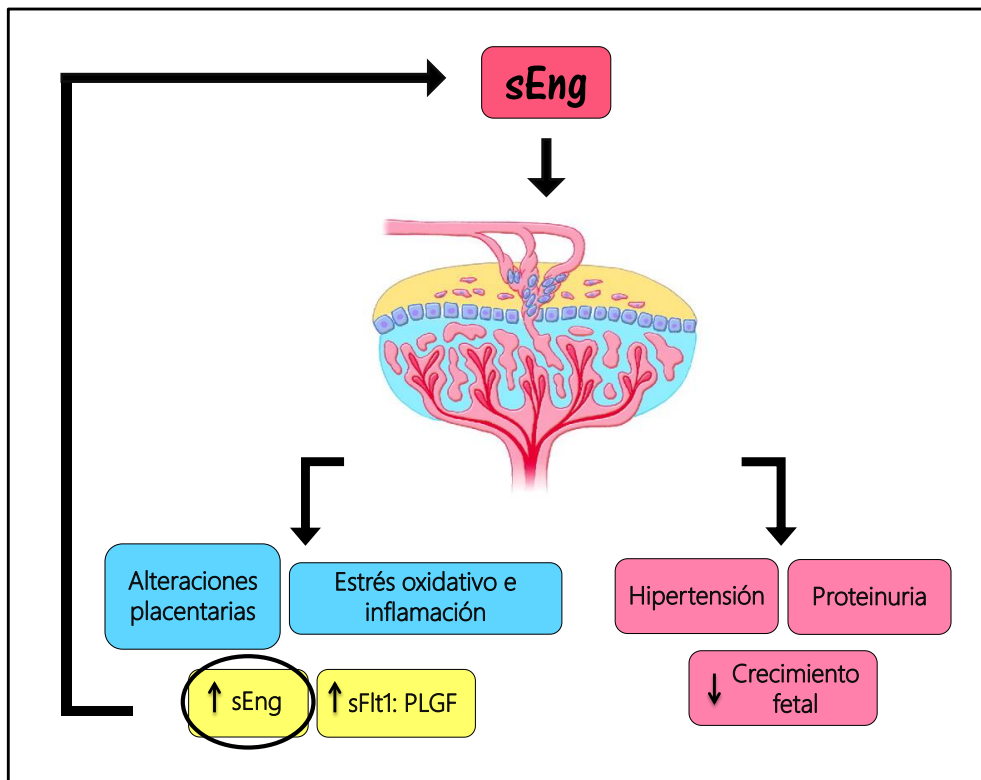
de infiltración leucocitaria, esencial en la respuesta inflamatoria (Rossi et al, 2013). Según estos resultados, al tratarse de procesos distintos de la respuesta inflamatoria, sEng podría tener diferentes papeles en la inflamación, dependiendo de la fase de la respuesta inflamatoria que estudiemos. Sin embargo, en ninguno de estos estudios, los resultados han sido realizados en un modelo de preeclampsia *in vivo* o en células trofoblásticas, por lo que su función en esta enfermedad aún no ha sido claramente de mostrada.

Hasta la fecha, los estudios realizados en modelos animales de preeclampsia en los que se ha relacionado estrés oxidativo e inflamación con sEng, han demostrado que estos procesos favorece al aumento de los niveles sEng observado en preeclampsia. Valbuena y cols demuestran que el aumento de oxisteroles presentes en preeclampsia estimula la liberación de sEng (Valbuena-Diez et al, 2012). Así mismo, se ha demostrado que el exceso de factores inflamatorios, como el TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , a través de la inhibición de la enzima HO-1, induce un aumento en los niveles de sEng (Cudmore et al, 2007). Sin embargo, no existe ningún estudio donde se haya demostrado la relación inversa, es decir, que el exceso de sEng favorezca el incremento de estrés oxidativo e inflamación en un modelo de preeclampsia.

En nuestro modelo "sEng+", se podrían estar dando las dos tipos de asociaciones. Por un lado, observamos que el aumento de sEng contribuye al aumento de estrés oxidativo e inflamación, y por otro, detectamos un aumento de sEng endógena al final de la gestación, posterior al aumento de citocinas inflamatorias y estrés oxidativo, por lo que podrían estar favoreciendo la liberación de sEng endógena.

Por tanto, a la vista de estos resultados, y en concordancia con la hipótesis obtenida en el apartado anterior, sugerimos que la sobreexpresión de sEng

contribuye con el estado oxidativo e inflamatorio, y que el incremento de ROS y citocinas inflamatorias favorecen la liberación de sEng. Se generaría, de este modo, una retroalimentación positiva que agravaría la sintomatología de la enfermedad.



**FIGURA 57:** Efecto de sEng en la gestación

Endoglina soluble contribuye a la aparición de la sintomatología de la preeclampsia, alteraciones placentarias, estrés oxidativo e inflamación. Estas modificaciones dan lugar al aumento del ratio sFlt1:PLGF e incremento de la concentración de sEng plasmática, lo que da lugar a una retroalimentación positiva.

## Estudios *in vitro*

En este trabajo observamos que sEng induce una reducción de los procesos de proliferación e invasión celular. Debido a su importancia en el remodelado arterial, nos centramos en el estudio del proceso de invasión celular. Quisimos comprobar qué proceso o procesos estaban implicados en la reducción de la invasión trofoblástica por parte de sEng.

En primer lugar, descartamos el aumento de muerte celular inducida por sEng, como posible causa de la reducción de estos procesos trofoblásticos en células JAr. Así mismo, tampoco observamos un incremento de muerte celular tras el análisis de las tinciones de H&E de placentas de gestantes sEng+ comparadas con las de las WT.

A continuación, estudiamos el efecto de sEng en el proceso de degradación de la matriz extracelular, imprescindible para la correcta invasión. Dong *y cols* asociaron la reducción en la invasión trofoblástica tras el tratamiento con sEng, con una reducción de la expresión de metaloproteinasa, enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular. Sin embargo, nuestros resultados no muestran una alteración en este proceso. No se observó ningún efecto de sEng en la actividad enzimática de las metaloproteasas en células JAr, por lo que en nuestro caso, descartamos alteraciones en este fenómeno.

Otro de los procesos que puede influir en la invasión de los trofoblastos es lo que conocemos como pseudo-vasculogénesis. Como ya explicamos, consiste en la diferenciación de los trofoblastos con un fenotipo epitelial, evCT, a otro fenotipo más endotelial, enCT. Este proceso se ha asociado con un cambio en la expresión de moléculas de adhesión intercelulares. En preeclampsia, se ha observado una

fuerte tinción de Ecaderina, molécula asociada a un fenotipo epitelial, y una tinción más tenue de VEcadherina, y CD31, asociadas a un fenotipo endotelial, en placentas procedentes de mujeres con preeclampsia (Fisher, 2004; Goksu Erol et al, 2012; Zhou et al, 1997b).

Ecaderina o Cadherina 1 es una proteína de la familia de las cadherinas expresada principalmente en las células epiteliales. Ecaderina estabiliza la estructura epitelial previniendo la invasión mediante la inhibición de la diferenciación a un fenotipo invasivo. La desregulación de esta proteína se ha asociado con una mayor capacidad invasiva en células tumorales (D'Souza-Schorey, 2005). Por otro lado, CD31 o PECAM-1, es una proteína de la familia de las inmunoglobulinas que se expresa en niveles elevados en la superficie de las células endoteliales. Está implicada en interacciones entre células adyacentes (Muller et al, 1989; Wu & Sheibani, 2003), entre células endoteliales y circulantes y con las células de la matriz extracelular (Sheibani et al, 1999). Ratones transgénicos deficientes en endogлина (*Eng*<sup>+/-</sup>) presentan una disminución en los niveles de VEcadherina y CD31 en células endoteliales (Jerkic & Letarte, 2015; Park et al, 2013). Puesto que sEng podría estar actuando como antagonista de la señalización a través de endogлина de membrana, como ya explicamos en la introducción de este trabajo, el aumento de expresión de sEng podría tener un efecto fisiológico similar que la deficiencia de endogлина de membrana, manifiesta en los ratones *Eng*<sup>+/-</sup>.

Apoyando esta hipótesis, nuestros resultados muestran que el tratamiento con sEng disminuye la expresión de CD31, tanto en trofoblastos creciendo en cultivos, como en explantes placentarios, así como incrementa la expresión de Ecaderina en explantes placentarios. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en la expresión de VEcadherina.

Por tanto, a la vista de estos resultados, podemos concluir que sEng podría estar alterando el proceso de pseudo-vasculogénesis mediante la inhibición de la expresión de CD31 y el mantenimiento de Ecadherina, lo cual implica un mantenimiento del fenotipo epitelial del trofoblasto, que tiene como resultado una reducción en el proceso de invasión celular. Sin embargo, estos estudios se han realizado en ausencia de un estímulo de invasión, por lo que para estudiar como realmente actúa sEng durante el proceso de invasión, tendríamos que analizar la expresión de estas moléculas durante dicho proceso, donde el cambio de fenotipo esté estimulado.

## sEng y BMP4

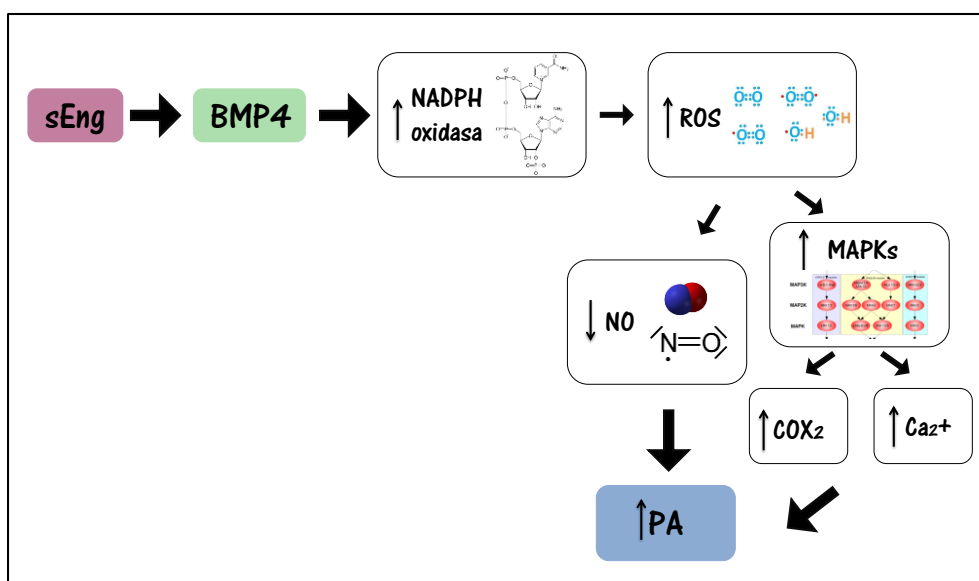
Como ya hemos comentado en el apartado de *Resultados*, estudios previos en colaboración con el grupo del Dr. Carmelo Bernabeu, demostraron que sEng incrementa los niveles de expresión BMP4 en células endoteliales. Además se ha observado que los ratones transgénicos *sol.eng*<sup>+</sup> tiene concentraciones elevadas de BMP4 en plasma y en diferentes órganos como pulmón, estómago y duodeno (datos no publicados).

En nuestro modelo de preeclampsia observamos un aumento de la concentración plasmática de BMP4 en las gestantes sEng<sup>+</sup> en comparación con las WT al final de la preñez. Sin embargo, no observamos diferencias en la expresión del ARNm de BMP4 entre las placentas de sEng<sup>+</sup> y WT. Además, tampoco detectamos un aumento de la liberación de BMP4 al medio tras el tratamiento, tanto de células JAr como explantes placentarios, con sEng. Por tanto, a diferencia de las células endoteliales, los trofoblastos, no incrementan la liberación de BMP4

tras el tratamiento con sEng. Por ello, el aumento de BMP4 plasmático observado en las ratonas sEng+ podría deberse al efecto sistémico de sEng sobre otro órganos maternos que favorecería la liberación de BMP4 al plasma.

Tradicionalmente, BMP4 se ha asociado con los procesos de crecimiento óseo, calcificación, desarrollo embrionario, formación de cartílago y diferenciación celular (Hogan, 1996; Li & Wozney, 2001; Massague, 2000). Los nuevos estudios existentes le han otorgado a BMP4 un papel en inflamación vascular y endotelial (Sorescu et al, 2003). Se ha descrito que BMP4 activa la enzima NADPH oxidasa en células endoteliales en cultivo, que incrementa los niveles de ROS. El aumento de estrés oxidativo promueve la expresión de moléculas de adhesión intracelular y la adhesión monocitaria, lo que estimula la respuesta inflamatoria (Sorescu et al, 2004). Además, la infusión de BMP4 a ratones, conlleva también, la activación de la NADPH oxidasa, que incrementa los niveles de anión superóxido, dando lugar a una reducción de la biodisponibilidad de NO, y por tanto, a una alteración de la vaso-relajación de endotelio y a un incremento de la presión arterial (Miriya et al, 2006). La hipertensión y disfunción endotelial promovida por BMP4, se ha asociado también, a una activación de la cascada de señalización BMP4/ROS/COX-2. Según estos estudios, el aumento de ROS inducido por BMP4, aumentan los niveles de COX-2 a través de la activación de ruta de MAPKs (Wong et al, 2010). Además, la activación de las MAPKs, promueve también, un incremento de la concentración calcio disponible, que estimula la contracción arterial, lo que se ha relacionado con la hipertensión pulmonar (Lu et al, 2010). Por otro lado, se ha demostrado, que el incremento en los niveles de BMP4, a su vez, están promovidos por un estado de hipoxia, debido a su regulación por el factor de transcripción HIF-1 (Wang et al, 2015).

Tomando todos estos estudios en conjunto, y a la vista de nuestros resultados, podemos deducir que el aumento de concentración plasmática de sEng se relaciona con un incremento de BMP4 en plasma. Sin embargo, el aumento de BMP4 no se produce de forma inmediata tras la aparición de sEng, sino que es detectado en plasma días después, coincidiendo con el aumento de presión arterial en estos animales. Por tanto, esto nos hace pensar que BMP4 podría estar implicado en la hipertensión observada en preeclampsia a través de la activación las rutas de señalización descritas en los trabajos anteriores (FIGURA 58).



**FIGURA 58:**

**Mecanismo de acción de sEng, a través de BMP4, sobre la presión arterial**

Endoglina soluble favorece al aumento de BMP4 en plasma. BMP4 activa la enzima NADPH oxidasa que incrementa los niveles de ROS, que, a través de la activación de la vía de las MAPKs, estimula la liberación de COX<sub>2</sub> y Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> (Lu et al, 2010; Wong et al, 2010). Por otro lado, el aumento de ROS, también disminuye la expresión de NO (Miriylala et al, 2006). Tanto COX<sub>2</sub>, Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> como la disminución de NO, podrían contribuir al aumento de presión arterial (PA) descrito en preeclampsia.



## Papel de sEng en preeclampsia

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados, podemos deducir que los altos niveles de sEng presentes en el plasma de mujeres con preeclampsia, días antes de la aparición de los síntomas clínicos, contribuyen a cambios en las funciones básicas de los trofoblastos, que podría dar lugar a defectos en la placentación. Esto favorecería la aparición de alteraciones patológicas observadas en esta enfermedad a nivel placentario: reducción de flujo uterino, aumento de hipoxia placentaria, estrés oxidativo, aumento de citocinas inflamatorias, liberación de receptores solubles, etc.

El aumento de sEng en plasma también actúa a nivel sistémico, afectando a otros órganos como al riñón, donde hemos observado, en los ratones transgénicos *sol.eng+*, alteraciones como la pérdida de podocitos de la membrana basal glomerular (Rossi et al, 2016). En estos ratones *sol.eng+*, además observamos otro tipo de alteraciones, como depósitos hialinos y aumento de infiltración celular, que podrían ser la causa del incremento de la excreción de proteínas en la orina. Sin embargo, estas últimas alteraciones observadas en los transgénicos no las apreciamos en las gestantes sEng+, a pesar de detectar también un aumento de proteinuria. Estas diferencias entre los dos modelos animales pueden deberse al tiempo de exposición a sEng, ya que, mientras que las gestantes sEng+ presentan altas concentraciones de sEng durante un corto periodo de tiempo, los transgénicos *sol.eng+* están expuestos durante toda su vida.

Además, en preeclampsia también existen alteraciones a nivel vascular, como disfunción endotelial. El aumento de la expresión de sEng contribuye al aumento de sEng endógena y del ratio sFlt1:PlGF, que pueden, a su vez, contribuir a la disfunción

endotelial presente en esta enfermedad. Además, observamos que sEng se asocia a un incremento de presión arterial. El aumento de presión arterial podría estar favorecido por la liberación de BMP4 al plasma, ya que se ha demostrado que altos niveles plasmáticos de BMP4 se relacionan con una alteración de la vaso-relajación e incremento de la contracción arterial (Frank et al, 2005; Lu et al, 2010; Miriyala et al, 2006; Wong et al, 2010).

El aumento de expresión de sEng también contribuye a la reducción del crecimiento fetal. Esto puede deberse, tanto a una disminución del suministro energético al feto por alteraciones en la movilización de las reservas de glucógeno, como a una reducción del flujo uterino por alteraciones en el remodelado arterial.

Por otro lado, destacamos el efecto de la retroalimentación positiva de sEng, ya que, como hemos discutido anteriormente, alteraciones inducidas por los altos niveles de sEng en plasma podría contribuir a la liberación de sEng endógena, así como al aumento del ratio sFlt1:PlGF, que favorecería en el agravamiento de la sintomatología.

Con este trabajo abrimos un nuevo campo en el estudio de la preeclampsia. Nuestros resultados muestran evidencias de que sEng juega un papel importante en esta patología. No obstante, para afirmar definitivamente esta hipótesis, serían necesarios estudios más exhaustivos del mecanismo de actuación de sEng en las circunstancias en las que se desarrolla esta enfermedad. Nuestro estudios también sugieren que los elevados niveles plasmáticos de sEng en la preeclampsia podrían ser una diana terapéutica para el desarrollo de un posible tratamiento de esta enfermedad, y no solo como un marcador de pronóstico y diagnóstico de preeclampsia.

---

# CONCLUSIONES

---

*"The mind is not a vessel to be filled, but a fire to be kindled".*

Plutarch



From the results presented in this work, we come up to the following conclusions:

- According to our *in vivo* results:
  1. The model of high plasma levels of human soluble endoglin, described in this study, reproduces many of the characteristics of preeclampsia.
  2. High plasma levels of soluble endoglin are associated with preeclampsia symptoms.
  3. High plasma levels of soluble endoglin contribute to other alterations present in women affected by preeclampsia such as oxidative stress, inflammation, soluble factors release and placental alterations.
- According to our *in vitro* results:
  1. Soluble endoglin reduces proliferation and invasion in trophoblast cells.
  2. Soluble endoglin reduces the pseudo-vasculogenesis process.
  3. Soluble endoglin modifies the trophoblastic functions required for an adequate placental vascular remodeling.

In summary, this work demonstrates that a high plasmatic level of soluble endoglin is not only a biomarker of prognostic and diagnostic of preeclampsia, but also plays an important role in the etiology and pathology of this disease.



---

# BIBLIOGRAFÍA

---

*“Al final de la visita, siempre se acaba por tratar al amante mejor de lo que se quisiera”.*

*Stendhal*





AbdelHalim RM, Ramadan DI, Zeyada R, Nasr AS, Mandour IA (2016) Circulating Maternal Total Cell-Free DNA, Cell-Free Fetal DNA and Soluble Endoglin Levels in Preeclampsia: Predictors of Adverse Fetal Outcome? A Cohort Study. *Mol Diagn Ther* **20**: 135-149

Abitbol MM, Gallo GR, Pirani CL, Ober WB (1976a) Production of experimental toxemia in the pregnant rabbit. *American journal of obstetrics and gynecology* **124**: 460-470

Abitbol MM, Pirani CL, Ober WB, Driscoll SG, Cohen MW (1976b) Production of experimental toxemia in the pregnant dog. *Obstetrics and gynecology* **48**: 537-548

Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC (2002) Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Developmental biology* **250**: 358-373

Aita K, Etoh M, Hamada H, Yokoyama C, Takahashi A, Suzuki T, Hara M, Nagata M (2009) Acute and transient podocyte loss and proteinuria in preeclampsia. *Nephron* **112**: c65-70

Akison LK, Nitert MD, Clifton VL, Moritz KM, Simmons DG (2017) Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. *Placenta*

Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C (2010) The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**: 1634-1650

Anber V, Griffin BA, McConnell M, Packard CJ, Shepherd J (1996) Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis* **124**: 261-271

Anderberg C, Cunha SI, Zhai Z, Cortez E, Pardali E, Johnson JR, Franco M, Paez-Ribes M, Cordiner R, Fuxe J, Johansson BR, Goumans MJ, Casanovas O, ten Dijke P, Arthur HM, Pietras K (2013) Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination. *The Journal of experimental medicine* **210**: 563-579

Aoki Y, Yamamoto T, Fumihisa C, Nakamura A, Asanuma A, Suzuki M (2012) Effect on the production of soluble endoglin from human choriocarcinoma cells by preeclampsia sera. *Am J Reprod Immunol* **67**: 413-420

Arkwright PD, Rademacher TW, Dwek RA, Redman CW (1993) Pre-eclampsia is associated with an increase in trophoblast glycogen content and glycogen synthase activity, similar to that found in hydatidiform moles. *The Journal of clinical investigation* **91**: 2744-2753

Aye IL, Waddell BJ, Mark PJ, Keelan JA (2011) Oxysterols inhibit differentiation and fusion of term primary trophoblasts by activating liver X receptors. *Placenta* **32**: 183-191

Aye IL, Waddell BJ, Mark PJ, Keelan JA (2012) Oxysterols exert proinflammatory effects in placental trophoblasts via TLR4-dependent, cholesterol-sensitive activation of NF-kappaB. *Mol Hum Reprod* **18**: 341-353

Baltimore D (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**: 1209-1211

Bamforth SD, Lightman S, Greenwood J (1996) The effect of TNF-alpha and IL-6 on the permeability of the rat blood-retinal barrier in vivo. *Acta Neuropathol* **91**: 624-632

Barbara NP, Wrana JL, Letarte M (1999) Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *The Journal of biological chemistry* **274**: 584-594

Barnett JM, Suarez S, McCollum GW, Penn JS (2014) Endoglin promotes angiogenesis in cell- and animal-based models of retinal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* **55**: 6490-6498

Bdolah Y, Lam C, Rajakumar A, Shivalingappa V, Mutter W, Sachs BP, Lim KH, Bdolah-Abram T, Epstein FH, Karumanchi SA (2008) Twin pregnancy and the risk of preeclampsia: bigger placenta or relative ischemia? *American journal of obstetrics and gynecology* **198**: 428 e421-426

Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M, Bernabeu C (1993) Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* **23**: 2340-2345

Benirschke K, Driscoll SG (1967) *The pathology of the human placenta*: Springer.

Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M (2009) The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1792**: 954-973

Bessman MJ, Lehman IR, Simms ES, Kornberg A (1958) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. *The Journal of biological chemistry* **233**: 171-177

Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A, Perez-Gomez E, Quintanilla M, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2008) S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circulation research* **103**: 1383-1392

Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JI, Sanchez-Rodriguez A, Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C (2010) Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC medicine* **8**: 86

Bodzek P, Janoszka B, Wielkoszynski T, Bodzek D, Sieron A (2002) Concentration of chosen oxysterols in plasma of pregnant women with pregnancy-induced hypertension. *Biomed Chromatogr* **16**: 13-18

Borges L, Iacovino M, Koyano-Nakagawa N, Baik J, Garry DJ, Kyba M, Perlingeiro RC (2013) Expression levels of endoglin distinctively identify hematopoietic and endothelial progeny at different stages of yolk sac hematopoiesis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **31**: 1893-1901

Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW (2006) Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med* **11**: 309-316

Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *The Journal of clinical investigation* **104**: 1343-1351

Bourdeau A, Faughnan ME, Letarte M (2000) Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends in cardiovascular medicine* **10**: 279-285

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254

Brennan LJ, Morton JS, Davidge ST (2014) Vascular dysfunction in preeclampsia. *Microcirculation* **21**: 4-14

Brosens I (1964) A Study of the Spiral Arteries of the Decidua Basalis in Normotensive and Hypertensive Pregnancies. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* **71**: 222-230

Brosens I, Robertson WB, Dixon HG (1967) The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol Bacteriol* **93**: 569-579

Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG (1972) The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu* **1**: 177-191

Browne JC, Veall N (1953) The maternal placental blood flow in normotensive and hypertensive women. *J Obstet Gynaecol Br Emp* **60**: 141-147

Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, Forest JC, Giguere Y (2010) Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstetrics and gynecology* **116**: 402-414

Burke SD, Karumanchi SA (2013) Spiral artery remodeling in preeclampsia revisited. *Hypertension* **62**: 1013-1014

Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, Thorpe PE (1995) Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* **1**: 1623-1634

Burton GJ, Jauniaux E (2011) Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **25**: 287-299

Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC (2009) Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta* **30**: 473-482

Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ (1999) Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *The Journal of clinical investigation* **103**: 1641-1650

Caniggia I, Taylor CV, Ritchie JW, Lye SJ, Letarte M (1997) Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants. *Endocrinology* **138**: 4977-4988

Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M (2000) Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* **21 Suppl A**: S25-30

Carter AM (2007) Animal models of human placentation--a review. *Placenta* **28 Suppl A**: S41-47

Castonguay R, Werner ED, Matthews RG, Presman E, Mulivor AW, Solban N, Sako D, Pearsall RS, Underwood KW, Seehra J, Kumar R, Grinberg AV Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *The Journal of biological chemistry* **286**: 30034-30046

Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P (2003) Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *The Journal of biological chemistry* **278**: 10443-10449

Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, Zwinderman AH, Robson SC, Bindels PJ, Kleijnen J, Khan KS (2008) Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ* **178**: 701-711

Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC (2006) Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev Dyn* **235**: 3280-3294

Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2004) Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biology of reproduction* **70**: 1806-1813

Cockell AP, Learmont JG, Smarason AK, Redman CW, Sargent IL, Poston L (1997) Human placental syncytiotrophoblast microvillous membranes impair maternal vascular endothelial function. *Br J Obstet Gynaecol* **104**: 235-240

Combs CA, Katz MA, Kitzmiller JL, Brescia RJ (1993) Experimental preeclampsia produced by chronic constriction of the lower aorta: validation with longitudinal blood pressure measurements in conscious rhesus monkeys. *American journal of obstetrics and gynecology* **169**: 215-223

Conrad KP, Benyo DF (1997) Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* **37**: 240-249

Conrad KP, Miles TM, Benyo DF (1998) Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* **40**: 102-111

Craici IM, Wagner SJ, Bailey KR, Fitz-Gibbon PD, Wood-Wentz CM, Turner ST, Hayman SR, White WM, Brost BC, Rose CH, Grande JP, Garovic VD (2013) Podocyturia predates proteinuria and clinical features of preeclampsia: longitudinal prospective study. *Hypertension* **61**: 1289-1296

Cross JC (2003) The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin Genet* **64**: 96-103

Cruz-Gonzalez I, Pabon P, Rodriguez-Barbero A, Martin-Moreiras J, Pericacho M, Sanchez PL, Ramirez V, Sanchez-Ledesma M, Martin-Herrero F, Jimenez-Candil J, Maree AO, Sanchez-Rodriguez A, Martin-Luengo C, Lopez-Novoa JM (2008) Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine* **12**: 955-961

Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Fujisawa T, Coxall H, Chudasama K, Devey LR, Wigmore SJ, Abbas A, Hewett PW, Ahmed A (2007) Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation* **115**: 1789-1797

Chalazonitis A, Kessler JA (2012) Pleiotropic effects of the bone morphogenetic proteins on development of the enteric nervous system. *Dev Neurobiol* **72**: 843-856

Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *The Journal of biological chemistry* **275**: 25130-25138

Chen LM, Liu B, Zhao HB, Stone P, Chen Q, Chamley L (2010) IL-6, TNF $\alpha$  and TGF $\beta$  promote nonapoptotic trophoblast deportation and subsequently causes endothelial cell activation. *Placenta* **31**: 75-80

Chun D, Braga C, Chow C, Lok L (1964) Clinical Observations on Some Aspects of Hydatidiform Moles. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* **71**: 180-184

D'Souza-Schorey C (2005) Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. *Trends in cell biology* **15**: 19-26

De Maria FJ, See HY (1966) Role of the placenta in pre-eclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology* **94**: 471-476

Dechend R, Luft FC (2008) Angiogenesis factors and preeclampsia. *Nature medicine* **14**: 1187-1188

Dechend R, Viedt C, Muller DN, Ugele B, Brandes RP, Wallukat G, Park JK, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V, Dietz R, Haller H, Kreuzer J, Luft FC (2003) AT1

receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* **107**: 1632-1639

Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, Hartmann E, Kohler M (2008) Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochimica et biophysica acta* **1783**: 394-404

DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ (1999) Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *The American journal of pathology* **155**: 293-301

Dong W, Xu QX, Han YH, Yin LR (2011) [Inhibitory effects of soluble endoglin on invasive ability of cultured cytotrophoblasts of first trimester of pregnancy]. *Sheng Li Xue Bao* **63**: 267-271

Doridot L, Passet B, Mehats C, Rigourd V, Barbaux S, Ducat A, Mondon F, Vilotte M, Castille J, Breuiller-Fouche M, Daniel N, le Provost F, Bauchet AL, Baudrie V, Hertig A, Buffat C, Simeoni U, Germain G, Vilotte JL, Vaiman D (2013) Preeclampsia-like symptoms induced in mice by fetoplacental expression of STOX1 are reversed by aspirin treatment. *Hypertension* **61**: 662-668

Duhig K, Chappell LC, Shennan AH (2016) Oxidative stress in pregnancy and reproduction. *Obstet Med* **9**: 113-116

Duley L (2009) The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* **33**: 130-137

Eiland E, Nzerue C, Faulkner M (2012) Preeclampsia 2012. *J Pregnancy* **2012**: 586578

Emanuel M, Butt S (2015) Frequency and factors leading to recurrent pre-eclampsia. *J Pak Med Assoc* **65**: 1173-1177

Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**: 871-874



Farina A, Sekizawa A, De Sanctis P, Purwosunu Y, Okai T, Cha DH, Kang JH, Vicenzi C, Tempesta A, Wibowo N, Valvassori L, Rizzo N (2008) Gene expression in chorionic villous samples at 11 weeks' gestation from women destined to develop preeclampsia. *Prenat Diagn* **28**: 956-961

Fisher SJ (2004) The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol* **2**: 53

Fisher SJ (2015) Why is placentation abnormal in preeclampsia? *American journal of obstetrics and gynecology* **213**: S115-122

Fisher SJ, Roberts JM (1999) Defects in placentation and placental perfusion. *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy 2nd ed* Stanford, CT: Appleton & Lange: 377-394

Fournier T, Handschuh K, Tsatsaris V, Guibourdenche J, Evain-Brion D (2008) Role of nuclear receptors and their ligands in human trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* **77**: 161-170

Frank DB, Abtahi A, Yamaguchi DJ, Manning S, Shyr Y, Pozzi A, Baldwin HS, Johnson JE, de Caestecker MP (2005) Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. *Circulation research* **97**: 496-504

Freeman BA, Crapo JD (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **47**: 412-426

Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ (1996) Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation* **97**: 540-550

Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ (1997) Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science (New York, NY)* **277**: 1669-1672

Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2002) Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* **23**: 3-19

Germain SJ, Sacks GP, Sooranna SR, Sargent IL, Redman CW (2007) Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J Immunol* **178**: 5949-5956

Ghi T, Youssef A, Piva M, Contro E, Segata M, Guasina F, Gabrielli S, Rizzo N, Pelusi G, Pilu G (2009) The prognostic role of uterine artery Doppler studies in patients with late-onset preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology* **201**: 36 e31-35

Ghulmiyyah L, Sibai B (2012) Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin Perinatol* **36**: 56-59

Gilbert JS, Babcock SA, Granger JP (2007) Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. *Hypertension* **50**: 1142-1147

Gilbert JS, Gilbert SA, Arany M, Granger JP (2009) Hypertension produced by placental ischemia in pregnant rats is associated with increased soluble endoglin expression. *Hypertension* **53**: 399-403

Goksu Erol AY, Nazli M, Elis Yildiz S (2012) Significance of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expressions in preeclamptic placentae. *Endocrine* **42**: 125-131

Gorlach A, Bonello S (2008) The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *The Biochemical journal* **412**: e17-19

Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, Fuchisawa A, Redman CW, Sargent IL, von Dadelszen P (2006) Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta* **27**: 56-61

Gougos A, Letarte M (1988) Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* **141**: 1925-1933

Gougos A, Letarte M (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **265**: 8361-8364

Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Buhning HJ, Bernabeu C, van Mourik JA, Letarte M (1992) Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *International immunology* **4**: 83-92

Graulich W, Nettelbeck DM, Fischer D, Kissel T, Muller R (1999) Cell type specificity of the human endoglin promoter. *Gene* **227**: 55-62

Gregory AL, Xu G, Sotov V, Letarte M (2014) Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta* **35 Suppl**: S93-99

Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dallenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, Lapaire O (2009) Potential markers of preeclampsia--a review. *Reprod Biol Endocrinol* **7**: 70

Gu Y, Lewis DF, Wang Y (2008) Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **93**: 260-266

Gupta AK, Rusterholz C, Huppertz B, Malek A, Schneider H, Holzgreve W, Hahn S (2005) A comparative study of the effect of three different syncytiotrophoblast micro-particles preparations on endothelial cells. *Placenta* **26**: 59-66

Gupta S, Aziz N, Sekhon L, Agarwal R, Mansour G, Li J, Agarwal A (2009) Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. *Obstetrical & gynecological survey* **64**: 750-759

Guyton AC, Hall JE, Guyton AC (2006) *Tratado de fisiologia médica*: Elsevier Brasil.

Hahn D, Blaschitz A, Korgun ET, Lang I, Desoye G, Skofitsch G, Dohr G (2001) From maternal glucose to fetal glycogen: expression of key regulators in the human placenta. *Mol Hum Reprod* **7**: 1173-1178

Harmon AC, Cornelius DC, Amaral LM, Faulkner JL, Cunningham MW, Jr., Wallace K, LaMarca B (2016) The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin Sci (Lond)* **130**: 409-419

Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, Sier CF, ten Dijke P (2010) Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer research* **70**: 4141-4150

Henao DE, Saleem MA (2013) Proteinuria in preeclampsia from a podocyte injury perspective. *Curr Hypertens Rep* **15**: 600-605

Henderson JT, Thompson JH, Burda BU, Cantor A (2017) Preeclampsia Screening: Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA* **317**: 1668-1683

Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM (1999) A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol* **163**: 3491-3495

Henry-Berger J, Mouzat K, Baron S, Bernabeu C, Marceau G, Saru JP, Sapin V, Lobaccaro JM, Caira F (2008) Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. *Biology of reproduction* **78**: 968-975

Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA (2000) Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free radical biology & medicine* **28**: 1456-1462

Hod T, Cerdeira AS, Karumanchi SA (2015) Molecular Mechanisms of Preeclampsia. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**

Hofmann S, Grasberger H, Jung P, Bidlingmaier M, Vlotides J, Janssen OE, Landgraf R (2002) The tumour necrosis factor-alpha induced vascular permeability is associated with a reduction of VE-cadherin expression. *Eur J Med Res* **7**: 171-176

Hofmeyr GJ, Lawrie TA, Atallah AN, Duley L (2010) Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst Rev*: CD001059

Hogan BL (1996) Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 432-438

Holder BS, Tower CL, Jones CJ, Aplin JD, Abrahams VM (2012) Heightened pro-inflammatory effect of preeclamptic placental microvesicles on peripheral blood immune cells in humans. *Biology of reproduction* **86**: 103

Huang KP, Chen CH, Robinson JC (1978) Glycogen synthesis by choriocarcinoma cells in vitro. Active synthesis in the presence of the glucose 6-phosphate-dependent form of glycogen synthase. *The Journal of biological chemistry* **253**: 2596-2603

Hung TH, Skepper JN, Burton GJ (2001) In vitro ischemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *The American journal of pathology* **159**: 1031-1043

Huppertz B, Gauster M, Orendi K, König J, Moser G (2009) Oxygen as modulator of trophoblast invasion. *J Anat* **215**: 14-20

Hustin J, Jauniaux E, Schaaps JP (1990) Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion. *Placenta* **11**: 477-486

Ikemoto T, Hojo Y, Kondo H, Takahashi N, Hirose M, Nishimura Y, Katsuki T, Shimada K, Kario K (2012) Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. *Heart and vessels* **27**: 344-351

Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha

and LXRbeta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 266-271

Jaschevatzky OE, Rosenberg RP, Shalit A, Zonder HB, Grunstein S (1990) Protein/creatinine ratio in random urine specimens for quantitation of proteinuria in preeclampsia. *Obstetrics and gynecology* **75**: 604-606

Jauniaux E, Jurkovic D, Campbell S (1995) Current topic: in vivo investigation of the placental circulations by Doppler echography. *Placenta* **16**: 323-331

Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ (2000) Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *The American journal of pathology* **157**: 2111-2122

Jerkic M, Letarte M (2015) Increased endothelial cell permeability in endoglin-deficient cells. *Faseb J* **29**: 3678-3688

Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carron R, Sanz-Rodriguez F, Perez-Barriocanal F, Rodriguez-Barbero A, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM (2004) Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb J* **18**: 609-611

Jerkic M, Rodriguez-Barbero A, Prieto M, Toporsian M, Pericacho M, Rivas-Elena JV, Obreo J, Wang A, Perez-Barriocanal F, Arevalo M, Bernabeu C, Letarte M, Lopez-Novoa JM (2006) Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovascular research* **69**: 845-854

Jones CJ, Whittle SC, Aplin JD (2016) A simple histochemical method for the identification of cytotrophoblasts in tissue sections. *Placenta* **42**: 84-86

Kacian DL, Myers JC (1976) Synthesis of extensive, possibly complete, DNA copies of poliovirus RNA in high yields and at high specific activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 2191-2195

Kaitu'u-Lino TJ, Palmer KR, Whitehead CL, Williams E, Lappas M, Tong S (2012) MMP-14 is expressed in preeclamptic placentas and mediates release of soluble endoglin. *The American journal of pathology* **180**: 888-894

Kapur NK, Morine KJ, Letarte M (2013) Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Vasc Health Risk Manag* **9**: 195-206

Karumanchi SA, Maynard SE, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP (2005) Preeclampsia: a renal perspective. *Kidney international* **67**: 2101-2113

Kaufmann P, Black S, Huppertz B (2003) Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biology of reproduction* **69**: 1-7

Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL (1998) Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* **105**: 632-640

Krane NK, Hamrahian M (2007) Pregnancy: kidney diseases and hypertension. *Am J Kidney Dis* **49**: 336-345

Kuklina EV, Ayala C, Callaghan WM (2009) Hypertensive disorders and severe obstetric morbidity in the United States. *Obstetrics and gynecology* **113**: 1299-1306

Labarrere CA (1988) Acute atherosclerosis. A histopathological hallmark of immune aggression? *Placenta* **9**: 95-108

Lam C, Lim KH, Karumanchi SA (2005) Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension* **46**: 1077-1085

LaMarca B, Amaral LM, Harmon AC, Cornelius DC, Faulkner JL, Cunningham MW, Jr. (2016) Placental Ischemia and Resultant Phenotype in Animal Models of Preeclampsia. *Curr Hypertens Rep* **18**: 38

LaMarca B, Parrish MR, Wallace K (2012) Agonistic autoantibodies to the angiotensin II type I receptor cause pathophysiologic characteristics of preeclampsia. *Genet Med* **9**: 139-146

LaMarca B, Wallace K, Granger J (2011) Role of angiotensin II type I receptor agonistic autoantibodies (AT1-AA) in preeclampsia. *Curr Opin Pharmacol* **11**: 175-179

Lang U, Baker RS, Khoury J, Clark KE (2000) Effects of chronic reduction in uterine blood flow on fetal and placental growth in the sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**: R53-59

Lau SY, Barrett CJ, Guild SJ, Chamley LW (2013) Necrotic trophoblast debris increases blood pressure during pregnancy. *J Reprod Immunol* **97**: 175-182

Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* **36**: 1-12

Lee VM, Quinn PA, Jennings SC, Ng LL (2003) NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension* **41**: 925-931

Lefebvre L (2012) The placental imprintome and imprinted gene function in the trophoblast glycogen cell lineage. *Reprod Biomed Online* **25**: 44-57

Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA (2006) Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *The New England journal of medicine* **355**: 992-1005

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA (2004) Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *The New England journal of medicine* **350**: 672-683

Li C, Issa R, Kumar P, Hampson IN, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C, Kumar S (2003) CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *Journal of cell science* **116**: 2677-2685

Li CG, Bethell H, Wilson PB, Bhatnagar D, Walker MG, Kumar S (2000) The significance of CD105, TGFbeta and CD105/TGFbeta complexes in coronary artery disease. *Atherosclerosis* **152**: 249-256



Li J, LaMarca B, Reckelhoff JF (2012) A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **303**: H1-8

Li RH, Wozney JM (2001) Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol* **19**: 255-265

Libermann TA, Baltimore D (1990) Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* **10**: 2327-2334

Lim JH, Kim SY, Park SY, Yang JH, Kim MY, Ryu HM (2008) Effective prediction of preeclampsia by a combined ratio of angiogenesis-related factors. *Obstetrics and gynecology* **111**: 1403-1409

Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H, Limbourg FP (2009) Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* **4**: 1737-1746

Lopez-Novoa JM (2007) Soluble endoglin is an accurate predictor and a pathogenic molecule in pre-eclampsia. *Nephrol Dial Transplant* **22**: 712-714

Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2010) The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**: H959-974

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**: 265-275

Lu W, Ran P, Zhang D, Lai N, Zhong N, Wang J (2010) Bone morphogenetic protein 4 enhances canonical transient receptor potential expression, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**: C1370-1378

Luan L, Yang X, Zhou C, Wang K, Qin L (2015) Post-hypoxic and ischemic neuroprotection of BMP-7 in the cerebral cortex and caudate-putamen tissue of rat. *Acta Histochem* **117**: 148-154

Lunell NO, Nylund LE, Lewander R, Sarby B (1982) Uteroplacental blood flow in pre-eclampsia measurements with indium-113m and a computer-linked gamma camera. *Clin Exp Hypertens B* **1**: 105-117

Maeyama M, Matsuo I, Nakahara K (1977) Glycogen metabolism in vesicles of hydatidiform mole in vitro. *Fertil Steril* **28**: 851-855

Mano Y, Kotani T, Shibata K, Matsumura H, Tsuda H, Sumigama S, Yamamoto E, Iwase A, Senga T, Kikkawa F (2011) The loss of endoglin promotes the invasion of extravillous trophoblasts. *Endocrinology* **152**: 4386-4394

Many A, Roberts JM (1997) Increased xanthine oxidase during labour--implications for oxidative stress. *Placenta* **18**: 725-726

Marzioni D, Capparuccia L, Todros T, Giovannelli A, Castellucci M (2005) Growth factors and their receptors: fundamental molecules for human placental development. *Ital J Anat Embryol* **110**: 183-187

Massague J (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nature reviews* **1**: 169-178

Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation* **111**: 649-658

Maynard SE, Moore Simas TA, Bur L, Crawford SL, Solitro MJ, Meyer BA (2010) Soluble endoglin for the prediction of preeclampsia in a high risk cohort. *Hypertens Pregnancy* **29**: 330-341

Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A (1994) A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* **101**: 669-674

Meler E, Figueras F, Bennasar M, Gomez O, Crispi F, Gratacos E (2010a) The prognostic role of uterine artery Doppler investigation in patients with severe early-onset preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology* **202**: 559 e551-554

Meler E, Figueras F, Mula R, Crispi F, Benassar M, Gomez O, Gratacos E (2010b) Prognostic role of uterine artery Doppler in patients with preeclampsia. *Fetal Diagn Ther* **27**: 8-13

Messerli M, May K, Hansson SR, Schneider H, Holzgreve W, Hahn S, Rusterholz C (2010) Feto-maternal interactions in pregnancies: placental microparticles activate peripheral blood monocytes. *Placenta* **31**: 106-112

Miriyala S, Gongora Nieto MC, Mingone C, Smith D, Dikalov S, Harrison DG, Jo H (2006) Bone morphogenic protein-4 induces hypertension in mice: role of noggin, vascular NADPH oxidases, and impaired vasorelaxation. *Circulation* **113**: 2818-2825

Molnar M, Suto T, Toth T, Hertelendy F (1994) Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *American journal of obstetrics and gynecology* **170**: 1458-1466

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63

Mueller A, Koebnick C, Binder H, Hoffmann I, Schild RL, Beckmann MW, Dittrich R (2005) Placental defence is considered sufficient to control lipid peroxidation in pregnancy. *Medical hypotheses* **64**: 553-557

Muller WA, Ratti CM, McDonnell SL, Cohn ZA (1989) A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *The Journal of experimental medicine* **170**: 399-414

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273

Munaut C, Lorquet S, Pequeux C, Blacher S, Berndt S, Frankenne F, Foidart JM (2008) Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast. *Human reproduction (Oxford, England)* **23**: 1407-1415

Muntener M, Hsu YC (1977) Development of trophoblast and placenta of the mouse. A reinvestigation with regard to the in vitro culture of mouse trophoblast and placenta. *Acta anatomica* **98**: 241-252

Nakashima A, Yamanaka-Tatematsu M, Fujita N, Koizumi K, Shima T, Yoshida T, Nikaido T, Okamoto A, Yoshimori T, Saito S (2013) Impaired autophagy by soluble endoglin, under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia. *Autophagy* **9**: 303-316

Nemeckova I, Serwaczak A, Oujo B, Jezkova K, Rathouska J, Fikrova P, Varejckova M, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Chlopicki S, Nachtigal P (2015) High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PloS one* **10**: e0119665

Nunez-Gomez E, Pericacho M, Ollauri-Ibanez C, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM (2016) The role of endoglin in post-ischemic revascularization. *Angiogenesis*

Palmer SK, Moore LG, Young D, Cregger B, Berman JC, Zamudio S (1999) Altered blood pressure course during normal pregnancy and increased preeclampsia at high altitude (3100 meters) in Colorado. *American journal of obstetrics and gynecology* **180**: 1161-1168

Pardali E, Ten Dijke P (2012) TGFbeta signaling and cardiovascular diseases. *Int J Biol Sci* **8**: 195-213

Park S, Dimaio TA, Liu W, Wang S, Sorenson CM, Sheibani N (2013) Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF-beta signaling pathways. *Journal of cell science* **126**: 1392-1405

Pavan L, Hermouet A, Tsatsaris V, Therond P, Sawamura T, Evain-Brion D, Fournier T (2004a) Lipids from oxidized low-density lipoprotein modulate human trophoblast invasion: involvement of nuclear liver X receptors. *Endocrinology* **145**: 4583-4591

Pavan L, Tsatsaris V, Hermouet A, Therond P, Evain-Brion D, Fournier T (2004b) Oxidized low-density lipoproteins inhibit trophoblastic cell invasion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**: 1969-1972

Pelletier J, Bellot G, Gounon P, Lacas-Gervais S, Pouyssegur J, Mazure NM (2012) Glycogen Synthesis is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival. *Front Oncol* **2**: 18

Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DJ (2012) Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech* **5**: 9-18

Perez-Gomez E, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M, Bernabeu C, Quintanilla M (2005) Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* **24**: 4450-4461

Perez-Gomez E, Villa-Morales M, Santos J, Fernandez-Piqueras J, Gamallo C, Dotor J, Bernabeu C, Quintanilla M (2007) A role for endoglin as a suppressor of malignancy during mouse skin carcinogenesis. *Cancer research* **67**: 10268-10277

Pescador N, Villar D, Cifuentes D, Garcia-Rocha M, Ortiz-Barahona A, Vazquez S, Ordonez A, Cuevas Y, Saez-Morales D, Garcia-Bermejo ML, Landazuri MO, Guinovart J, del Peso L (2010) Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS one* **5**: e9644

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED (1971) Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **78**: 957-962

Piering WF, Garancis JG, Becker CG, Beres JA, Lemann J, Jr. (1993) Preeclampsia related to a functioning extrauterine placenta: report of a case and 25-year follow-up. *Am J Kidney Dis* **21**: 310-313

Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G (1981) Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* **2**: 71-91

Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M (2006) The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* **27**: 939-958

Polliotti BM, Fry AG, Saller DN, Mooney RA, Cox C, Miller RK (2003) Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia. *Obstetrics and gynecology* **101**: 1266-1274

Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH (2006) Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **367**: 1145-1154

Poston L, Igosheva N, Mistry HD, Seed PT, Shennan AH, Rana S, Karumanchi SA, Chappell LC (2011) Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *Am J Clin Nutr* **94**: 1980S-1985S

Puhlmann M, Weinreich DM, Farma JM, Carroll NM, Turner EM, Alexander HR, Jr. (2005) Interleukin-1beta induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial tissue factor (TF) activity. *Journal of translational medicine* **3**: 37

Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, Wibowo N, Koide K, Okazaki S, Nakamura M, Okai T (2008) Evaluation of physiological alterations of the placenta through analysis of cell-free messenger ribonucleic acid concentrations of angiogenic factors. *American journal of obstetrics and gynecology* **198**: 124 e121-127

Qiu C, Phung TT, Vadachkoria S, Muy-Rivera M, Sanchez SE, Williams MA (2006) Oxidized low-density lipoprotein (Oxidized LDL) and the risk of preeclampsia. *Physiol Res* **55**: 491-500

Quintanilla M, Ramirez JR, Perez-Gomez E, Romero D, Velasco B, Letarte M, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2003) Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* **22**: 5976-5985

Rao AK, Daniels K, El-Sayed YY, Moshesh MK, Caughey AB (2006) Perinatal outcomes among Asian American and Pacific Islander women. *American journal of obstetrics and gynecology* **195**: 834-838

Recknagel RO, Glende EA, Jr. (1984) Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods in enzymology* **105**: 331-337

Redman CW, Sacks GP, Sargent IL (1999) Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* **180**: 499-506

Redman CW, Sargent IL (2003) Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta* **24 Suppl A**: S21-27

Redman CW, Sargent IL (2009) Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta* **30 Suppl A**: S38-42

Redman CW, Sargent IL, Staff AC (2014) IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia - two placental causes of preeclampsia? *Placenta* **35 Suppl**: S20-25

Redman CW, Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Southcombe JH, Collett GP, Sargent IL (2012) Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* **33 Suppl**: S48-54

Roa I, Smok C, Prieto R (2012) Placenta: Anatomía e Histología Comparada. *International Journal of Morphology* **30**: 1490-1496

Robb SA, Hytten FE (1976) Placental glycogen. *Br J Obstet Gynaecol* **83**: 43-53

Robbins JR, Skrzypczynska KM, Zeldovich VB, Kapidzic M, Bakardjiev AI (2010) Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* **6**: e1000732

Roberts DJ, Post MD (2008) The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Journal of clinical pathology* **61**: 1254-1260

Roberts JM (1998) Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* **16**: 5-15

Roberts JM, Cooper DW (2001) Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* **357**: 53-56

Roberts JM, Escudero C (2012) The placenta in preeclampsia. *Pregnancy hypertension* **2**: 72-83

Roberts JM, Hubel CA (2009) The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta* **30 Suppl A**: S32-37

Robertson WB (1976) Uteroplacental vasculature. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* **10**: 9-17

Robertson WB, Brosens I, Dixon HG (1967) The pathological response of the vessels of the placental bed to hypertensive pregnancy. *J Pathol Bacteriol* **93**: 581-592

Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E (1992) Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstetrics and gynecology* **80**: 283-285

Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Duwell A, Blanco FJ, Langa C, Botella LM, Cabanas C, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2013) Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* **121**: 403-415

Rossi E, Smadja DM, Boscolo E, Langa C, Arevalo MA, Pericacho M, Gamella-Pozuelo L, Kauskot A, Botella LM, Gaussem P, Bischoff J, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2016) Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system. *Cell Mol Life Sci* **73**: 1715-1739

Rousset M, Zweibaum A, Fogh J (1981) Presence of glycogen and growth-related variations in 58 cultured human tumor cell lines of various tissue origins. *Cancer research* **41**: 1165-1170



Sabapatha A, Gercel-Taylor C, Taylor DD (2006) Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol* **56**: 345-355

Sabba C, Gallitelli M, Pasculli G, Suppressa P, Resta F, Tafaro GE (2006) HHT: a rare disease with a broad spectrum of clinical aspects. *Current pharmaceutical design* **12**: 1217-1220

Sachs N, Sonnenberg A (2013) Cell-matrix adhesion of podocytes in physiology and disease. *Nat Rev Nephrol* **9**: 200-210

Sagol S, Ozkinay E, Ozsener S (1999) Impaired antioxidant activity in women with pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* **64**: 121-127

Salahuddin S, Lee Y, Vadnais M, Sachs BP, Karumanchi SA, Lim KH (2007) Diagnostic utility of soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin in hypertensive diseases of pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* **197**: 28 e21-26

Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *The Journal of biological chemistry* **277**: 43799-43808

Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L, Bernabeu C (2007) Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *Journal of cellular physiology* **210**: 456-468

Santillan MK, Santillan DA, Scroggins SM, Min JY, Sandgren JA, Pearson NA, Leslie KK, Hunter SK, Zamba GK, Gibson-Corley KN, Grobe JL (2014) Vasopressin in preeclampsia: a novel very early human pregnancy biomarker and clinically relevant mouse model. *Hypertension* **64**: 852-859

Schmidt A, Morales-Prieto DM, Pastuschek J, Frohlich K, Markert UR (2015) Only humans have human placentas: molecular differences between mice and humans. *J Reprod Immunol* **108**: 65-71

Schroepfer GJ, Jr. (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological reviews* **80**: 361-554

Sebire NJ, Sepulveda W (2008) Correlation of placental pathology with prenatal ultrasound findings. *Journal of clinical pathology* **61**: 1276-1284

Shafrir E, Barash V (1991) Placental glycogen metabolism in diabetic pregnancy. *Isr J Med Sci* **27**: 449-461

Sheibani N, Sorenson CM, Frazier WA (1999) Tissue specific expression of alternatively spliced murine PECAM-1 isoforms. *Dev Dyn* **214**: 44-54

Sibai BM, Coppage KH (2004) Diagnosis and management of women with stroke during pregnancy/postpartum. *Clin Perinatol* **31**: 853-868, viii

Simmons DG, Cross JC (2005) Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Developmental biology* **284**: 12-24

Sircar M, Thadhani R, Karumanchi SA (2015) Pathogenesis of preeclampsia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **24**: 131-138

Smarason AK, Sargent IL, Starkey PM, Redman CW (1993) The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic women on the growth of endothelial cells in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* **100**: 943-949

Smeets B, Moeller MJ (2012) Parietal epithelial cells and podocytes in glomerular diseases. *Seminars in nephrology* **32**: 357-367

Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S, Post M, Caniggia I (2005) Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **90**: 4299-4308

Sones JL, Davisson RL (2016) Preeclampsia, of mice and women. *Physiol Genomics* **48**: 565-572

Sorescu GP, Song H, Tressel SL, Hwang J, Dikalov S, Smith DA, Boyd NL, Platt MO, Lassegue B, Griendling KK, Jo H (2004) Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circulation research* **95**: 773-779

Sorescu GP, Sykes M, Weiss D, Platt MO, Saha A, Hwang J, Boyd N, Boo YC, Vega JD, Taylor WR, Jo H (2003) Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response. *The Journal of biological chemistry* **278**: 31128-31135

Srinivasan S, Hanes MA, Dickens T, Porteous ME, Oh SP, Hale LP, Marchuk DA (2003) A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Human molecular genetics* **12**: 473-482

St-Jacques S, Forte M, Lye SJ, Letarte M (1994) Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biology of reproduction* **51**: 405-413

Steck TL, Lange Y (2010) Cell cholesterol homeostasis: mediation by active cholesterol. *Trends in cell biology* **20**: 680-687

Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R (2010) Pre-eclampsia. *Lancet* **376**: 631-644

Szarka A, Rigo J, Jr., Lazar L, Beko G, Molvarec A (2010) Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol* **11**: 59

Szpera-Gozdziewicz A, Breborowicz GH (2014) Endothelial dysfunction in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Front Biosci (Landmark Ed)* **19**: 734-746

Tanaka M, Gertsenstein M, Rossant J, Nagy A (1997) Mash2 acts cell autonomously in mouse spongiotrophoblast development. *Developmental biology* **190**: 55-65

Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL (2013) Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin. *PLoS one* **8**: e56754

Taylor CT (2008) Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *The Journal of physiology* **586**: 4055-4059

Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA (2003) Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology* **188**: 177-182

Temin HM, Mizutani S (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**: 1211-1213

Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, Husain M, Letarte M (2005) A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circulation research* **96**: 684-692

Troisi R, Braekke K, Harsem NK, Hyer M, Hoover RN, Staff AC (2008) Blood pressure augmentation and maternal circulating concentrations of angiogenic factors at delivery in preeclamptic and uncomplicated pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology* **199**: 653 e651-610

Tseng WP, Yang SN, Lai CH, Tang CH (2010) Hypoxia induces BMP-2 expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 pathways in osteoblasts. *Journal of cellular physiology* **223**: 810-818

Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujó B, Langa C, Gonzalez-Nunez M, Llano E, Pendas AM, Diaz M, Castrillo A, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2012) Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation* **126**: 2612-2624

Varejckova M, Gallardo-Vara E, Vicens M, Vitverova B, Fikrova P, Dolezelova E, Rathouska J, Prasnicka A, Blazickova K, Micuda S, Bernabeu C, Nemeckova I, Nachtigal P (2017) Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF-kappaB and IL-6 in cultured human endothelial cells. *Life sciences* **175**: 52-60

Vejux A, Lizard G (2009) Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med* **30**: 153-170

Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature medicine* **12**: 642-649

Victor VM, Rocha M, Sola E, Banuls C, Garcia-Malpartida K, Hernandez-Mijares A (2009) Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Current pharmaceutical design* **15**: 2988-3002

Vigoda A, Mamedova LK, Shneyvays V, Katz A, Shainberg A (2003) Glycogen metabolism in rat heart muscle cultures after hypoxia. *Molecular and cellular biochemistry* **254**: 311-318

Villafruela JJ, Pascual J, Teruel JL, Naya MT, Rivera ME, Ortuno J (1990) Correlation between protein to creatinine ratio in a single urine sample and daily protein excretion. *Contributions to nephrology* **83**: 120-123

Voller A (1978) The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). *Ric Clin Lab* **8**: 289-298

von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM (2003) Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* **22**: 143-148

Waddell BJ, Hisheh S, Dharmarajan AM, Burton PJ (2000) Apoptosis in rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. *Biology of reproduction* **63**: 1913-1917

Walsh SW, Wang Y (1993) Deficient glutathione peroxidase activity in preeclampsia is associated with increased placental production of thromboxane and lipid peroxides. *American journal of obstetrics and gynecology* **169**: 1456-1461

Wang J, Dong X, Wu HY, Wu N, Zhang XJ, Wang X, Shang LX (2016) Relationship of Liver X Receptors alpha and Endoglin Levels in Serum and Placenta with Preeclampsia. *PloS one* **11**: e0163742

Wang J, Fu X, Yang K, Jiang Q, Chen Y, Jia J, Duan X, Wang EW, He J, Ran P, Zhong N, Semenza GL, Lu W (2015) Hypoxia inducible factor-1-dependent up-regulation of BMP4 mediates hypoxia-induced increase of TRPC expression in PSMCs. *Cardiovascular research* **107**: 108-118

Wang Y, Walsh SW (1996) TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas. *J Reprod Immunol* **32**: 157-169

Watson ED, Cross JC (2005) Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)* **20**: 180-193

Weedon-Fekjaer MS, Duttaroy AK, Nebb HI (2005) Liver X receptors mediate inhibition of hCG secretion in a human placental trophoblast cell line. *Placenta* **26**: 721-728

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* **14**: 353-356

White WM, Garrett AT, Craici IM, Wagner SJ, Fitz-Gibbon PD, Butters KA, Brost BC, Rose CH, Grande JP, Garovic VD (2014) Persistent urinary podocyte loss following preeclampsia may reflect subclinical renal injury. *PloS one* **9**: e92693

Whitley GS, Cartwright JE (2010) Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta* **31**: 465-474

Wilkins FC, Jr., Alberola A, Mizelle HL, Opgenorth TJ, Granger JP (1995) Systemic hemodynamics and renal function during long-term pathophysiological increases in circulating endothelin. *The American journal of physiology* **268**: R375-381

Winkler K, Wetzka B, Hoffmann MM, Friedrich I, Kinner M, Baumstark MW, Wieland H, Marz W, Zahradnik HP (2000) Low density lipoprotein (LDL) subfractions during

pregnancy: accumulation of buoyant LDL with advancing gestation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **85**: 4543-4550

Wong WT, Tian XY, Chen Y, Leung FP, Liu L, Lee HK, Ng CF, Xu A, Yao X, Vanhoutte PM, Tipoe GL, Huang Y (2010) Bone morphogenic protein-4 impairs endothelial function through oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2 upregulation: implications on hypertension. *Circulation research* **107**: 984-991

Wu J, Sheibani N (2003) Modulation of VE-cadherin and PECAM-1 mediated cell-cell adhesions by mitogen-activated protein kinases. *J Cell Biochem* **90**: 121-137

Wu M, Chen G, Li YP (2016) TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* **4**: 16009

Yinon Y, Nevo O, Xu J, Many A, Rolfo A, Todros T, Post M, Caniggia I (2008) Severe intrauterine growth restriction pregnancies have increased placental endoglin levels: hypoxic regulation via transforming growth factor-beta 3. *The American journal of pathology* **172**: 77-85

Zamudio S, Wu Y, Ietta F, Rolfo A, Cross A, Wheeler T, Post M, Illsley NP, Caniggia I (2007) Human placental hypoxia-inducible factor-1alpha expression correlates with clinical outcomes in chronic hypoxia in vivo. *The American journal of pathology* **170**: 2171-2179

Zhou CC, Irani RA, Zhang Y, Blackwell SC, Mi T, Wen J, Shelat H, Geng YJ, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y (2010) Angiotensin receptor agonistic autoantibody-mediated tumor necrosis factor-alpha induction contributes to increased soluble endoglin production in preeclampsia. *Circulation* **121**: 436-444

Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ (1997a) Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *The Journal of clinical investigation* **99**: 2152-2164

Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH (1997b) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A

strategy for successful endovascular invasion? *The Journal of clinical investigation* **99**: 2139-2151

Zhu Y, Sun Y, Xie L, Jin K, Sheibani N, Greenberg DA (2003) Hypoxic induction of endoglin via mitogen-activated protein kinases in mouse brain microvascular endothelial cells. *Stroke* **34**: 2483-2488



---

# SUMMARY

---

*"When you make the finding yourself  
- even if you're the last person on Earth to see the light-  
you'll never forget it".*

Carl Sagan



Preeclampsia is a pregnancy-specific disease which affect about 3-5% of all pregnancies worldwide (Eiland et al, 2012). It is the major cause of maternal, fetal and neonatal mortality in developed nations. Preeclampsia is characterized by hypertension ( $>140/90$  mmHg) and proteinuria ( $>300\text{mg}/24\text{hours}$ ) after 20 weeks of pregnancy. Moreover, these women can show others alterations such as endothelial dysfunction and dysfunctions in the liver, kidneys, brain, and in clotting system (Duley, 2009; Eiland et al, 2012). Therefore, the preeclampsia is considered a complex and multisystem disease (Pennington et al, 2012).

Despite of a large amount of studies about the physiopathology of preeclampsia, both the causes and the molecular pathogenesis of this alteration are mostly unknown yet. However, it is largely accepted that the placenta is an important factor in the pathology of this disease. This is evidenced by the rapid disappearance of disease's symptoms after delivery and their maintenance when the placenta is not retired (Chun et al, 1964). Therefore, the abnormalities in placental development have been extensively studied in order to understand the physiopathology of preeclampsia. Strong experimental evidence suggests that placental ischemia, resulting from the inappropriate remodeling of the maternal spiral arteries, stimulates the release of soluble factors causing hypertension and renal damage and other preeclampsia-induced alterations (Gilbert et al, 2007; Gilbert et al, 2009).

Several observations have associated high levels of soluble vasoactive factors in maternal circulation with the clinical manifestation of this disease (Dechend & Luft, 2008; Grill et al, 2009; Hod et al, 2015; Than et al, 2008). Plasma levels of Soluble fms-like kinase 1 (sFlt1, also known as soluble VEGF receptor-1) and soluble endoglin (sEng) are increased weeks before the onset of preeclampsia while PlGF factor is reduced (Farina et al, 2008; Lee et al, 2014; Lopez-Novoa, 2007). The amount of them in plasma is correlated with higher severity and worse prognostic of preeclampsia (Lopez-Novoa, 2007; Maynard et al, 2003; Purwosunu et al, 2008; Troisi et al, 2008; Venkatesha et al, 2006). For this reason they have been proposed as useful biomarkers for diagnostic and prognostic (Crovetto et al, 2014; Lopez-Novoa,

2007). There are only a few reports about the role of sEng in preeclampsia (Levine et al, 2006; Nemeckova et al, 2015; Valbuena-Diez et al, 2012; Venkatesha et al, 2006). We have shown that rodents exposed to high circulating levels of sEng show severe preeclampsia-like symptoms such as proteinuria and hypertension (Valbuena-Diez et al, 2012). Hence, it would be interesting to carry out more exhaustive studies about the importance of sEng in this pathology. Thus, our aim in this work was to study the role of sEng in the physiopathology of the preeclampsia.

For this purpose, we developed an animal model of this disease consisting in pregnant mice with higher plasma levels of soluble endoglin starting at mid-gestation, similar to what happens in preeclampsia. We crossed male transgenic mice with high plasma levels of human soluble endoglin (sol.eng+) previously generated in our laboratory (Valbuena-Diez et al, 2012) with female wild type mice. Pregnant mice resulting of this cross were called sEng+. Pregnant mice resulting of the cross between male wild type with female wild type mice, were called WT.

To validate our animal model, we determined the plasma concentrations of soluble human endoglin. The ELISA analysis showed increased levels of human endoglin in sEng+ mice from 11th day of gestation, reaching the highest levels at the end of gestation (FIGURE 1), in the same way that it occurs in preeclampsia. No human sEng was detected in pregnant WT mice. The appearance in plasma of human sEng with the same pattern that fetus growth suggests that human sEng comes from the sol.eng+ fetuses.

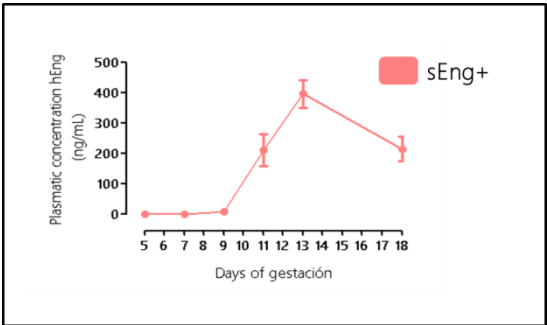


FIGURE 1:

Plasmatic concentration of hEng in sEng+ mice during gestation

We next evaluated the effect of sEng high plasma levels on clinical symptoms of preeclampsia. We observed higher arterial pressure (FIGURE 2.A) and urinary protein excretion (FIGURE 2.B) in sEng+ than in WT pregnant mice. Moreover, the litter weight was lower in the sEng+ compared with WT pregnant mice (FIGURE 2.C).

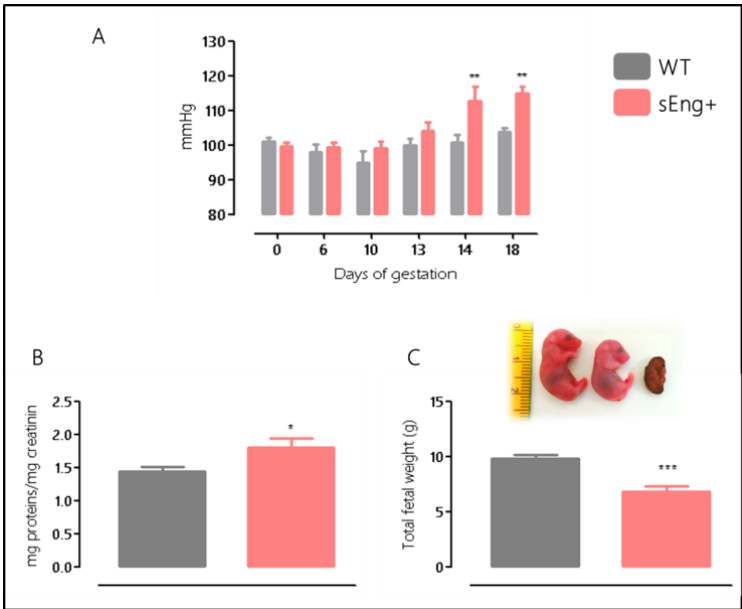
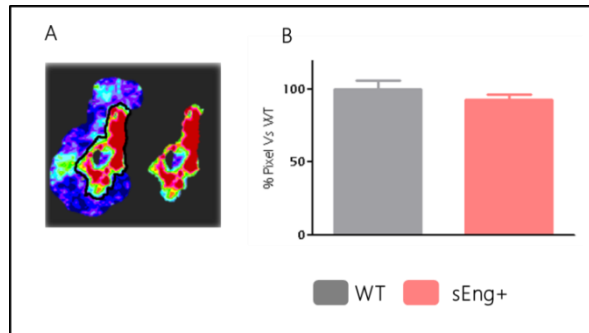


FIGURE 2:

A. Systolic pressure during gestation of WT and sEng+. B. Proteinuria at the end of gestation in WT and sEng+. C. Total fetal weight in WT and sEng+.

We also evaluated other preeclampsia characteristics such as placental, ischemia, oxidative stress, inflammation and plasma levels of soluble vasoactive factors.

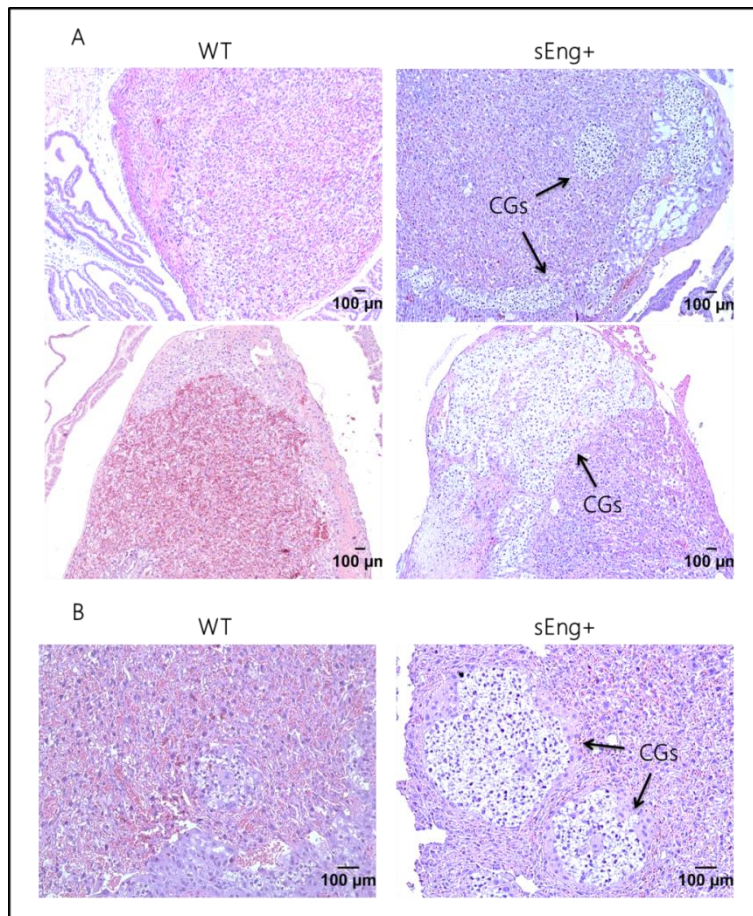
We did not found significant differences between sEng+ and WT pregnant mice in the placental blood supply measured by Laser Doppler technique (FIGURE 3).



**FIGURE 3:**

Evaluation of placental blood supply by Laser Doppler in WT and sEng+ at the end of gestation. **A.** Image corresponding to the measure area. **B.** Flow placental supply quantification

However, we found structural alteration in sEng+ placentas stained with hematoxylin & eosin at the end of gestation. We observed an unusual large accumulation of glycogen cells (GCs) in the last days of pregnancy in sEng+ but not in WT mice (FIGURE 4).

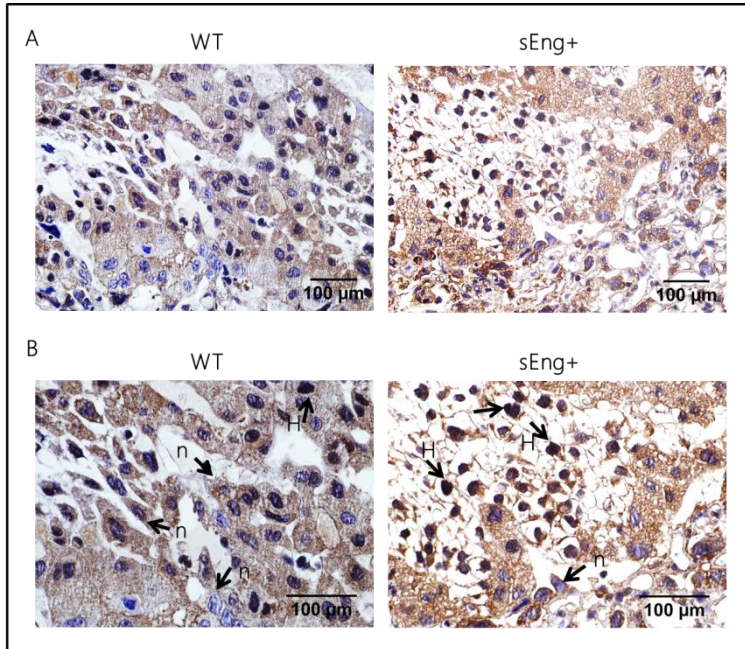


**FIGURE 4**

Glycogen cells (GCs) in WT and sEng+ placentas at the end of gestation.

The GC is a trophoblast cell of unknown origin that appears in the junction zone of the murine placenta. In normal murine pregnancy, CGs begin to accumulate glycogen and can be found as tightly packed clusters embedded within spongiotrophoblast cells until 12.5 days of gestation and their number steadily decrease until the end of pregnancy (Coan et al, 2006; Coan et al, 2004; Waddell et al, 2000) . However, in our model we did not observe this disappearing. There are accumulating data to suggest that changes in placental glycogen deposition is a hallmark feature of a compromised pregnancy associated with fetal growth restriction and also, paradoxically, with fetal overgrowth (Akison et al, 2017). On the whole,

these data suggest that high plasma levels of sEng present in our animal model, induce structural placental alterations.



**FIGURE 5:**

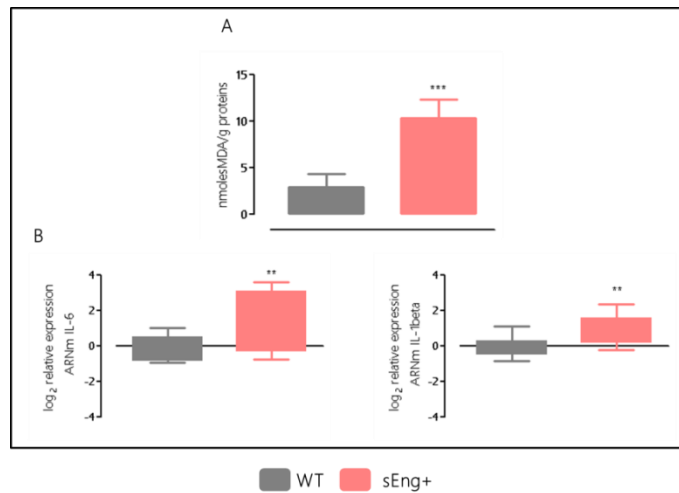
HIF1- $\alpha$  expression in WT and sEng+ placentas at the end of gestation. Normoxic (n) and hypoxic (H) nuclei are indicated.

On the other hand, we analyzed if high plasma levels of sEng contributes to placental hypoxia. Nuclear HIF-1 $\alpha$  expression was similar in both types of placentas, sEng+ and WT. However, this expression was higher in GCs at the end of gestation. Probably, CG is more metabolically active cell and needs more oxygen supply than the rest of trophoblasts. So, CGs expressed higher levels of nuclear HIF-1 $\alpha$  compared to the rest of placental cells (FIGURE 5).

Oxidative stress and inflammation also plays an important role in the pathophysiology of preeclampsia (Al-Gubory et al, 2010; Redman et al, 1999; Redman & Sargent, 2003; Redman et al, 2014). Thus, we studied these processes in placentas of our pregnant mice. Placentas of



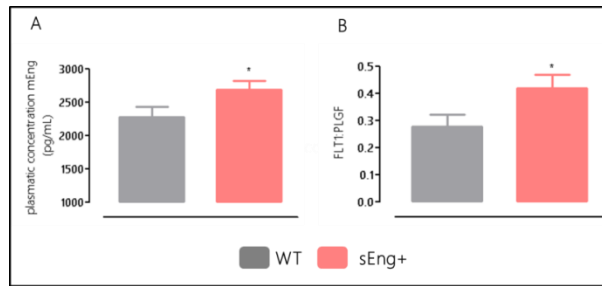
sEng<sup>+</sup> mice showed an early increase of placental lipid peroxidation compared with WT placentas (Figure 6). Moreover, we observed that the expression of inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-1 $\beta$  were higher in placenta of sEng<sup>+</sup> mice compare with WT.



**FIGURE 6:**

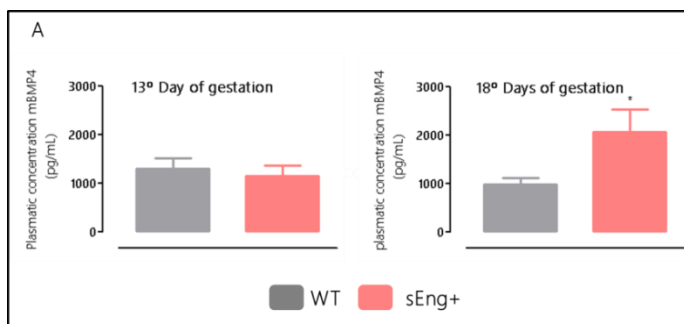
**A.** Placental content of lipid peroxides in WT and sEng<sup>+</sup> placentas at 13 days of gestation. **B.** Analysis of inflammation in placentas of WT and sEng<sup>+</sup> at the end of gestation. Inflammation was assessed as the mRNA expression of *IL-6* (left panel) and *IL-1 $\beta$*  (right panel).

Evaluation of plasmatic levels of endogenous soluble factors present in preeclampsia at the end of gestation, showed an increase mouse sEng levels and higher sFLT1:PIGF ratio in sEng<sup>+</sup> than WT pregnant mice (FIGURE 7). These results suggest that sEng overexpression also contribute with release of vasoactive soluble factors in our animal models.

**FIGURE 7:**

A. Plasmatic concentration of mEng in WT and sEng+ at the end of gestation. B. sFlt1:PIGF ratio in WT and sEng+ at the end of gestation.

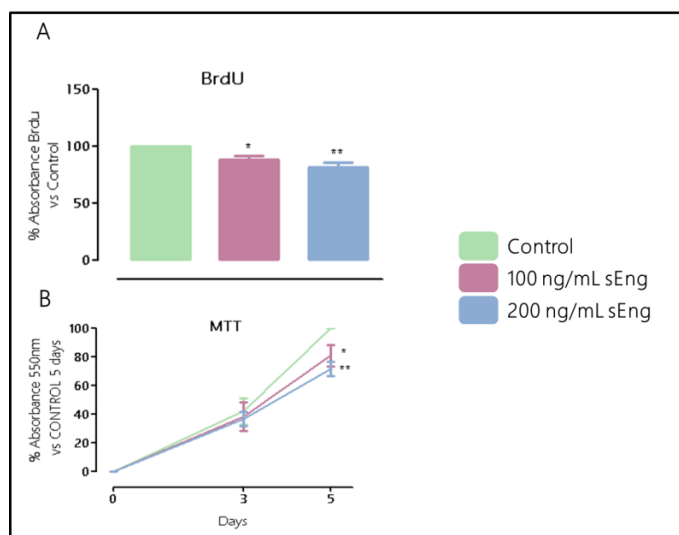
Previous results from our laboratory suggest that administration of sEng to endothelial cells induce release of BMP4 (data unpublished). We therefore assessed whether high plasma levels of human sEng increase plasma levels of BMP4 in our animal model and we observed that plasma levels of BMP4 increases in the last period of gestation (FIGURE 8). It has been demonstrated that BMP4 promote vascular remodeling and hypertension in mice (Frank et al, 2005; Miriyala et al, 2006; Wong et al, 2010). According with this studies we observed that the increase of BMP4 take place at the same time that the increase of pressure.

**FIGURE 8:**

Plasmatic concentration of BMP4 in WT and sEng+ at 13 days of gestation (A) and at 18 days of gestation (B).

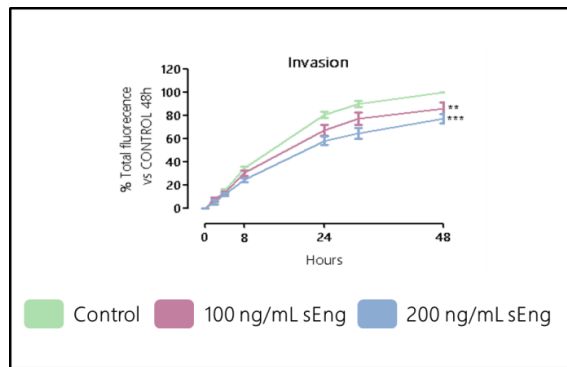
On the other hand, to study more exhaustively the effect of sEng in placental functions, we used a trophoblast cell line (JAR cells) and placental explants. JAR cells, a cell line derived from human choriocarcinoma cells, were treated with 100 ng/mL and 200 ng/mL of human recombinant endoglin (rhEng; (R&D Systems #1097-EN) and cell proliferation and invasion were analyzed.

We observed that sEng reduces proliferation, analyzed by MTT uptake and BRdU incorporation (FIGURE 9). Moreover, invasiveness of JAR cells through Matrigel® was also diminished with sEng treatment, whereas migration process was unaffected (FIGURE 10).



**FIGURE 9:**

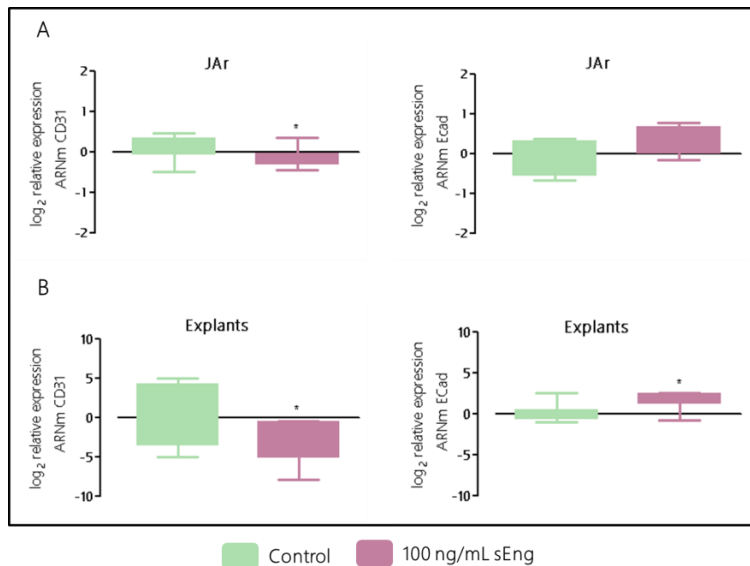
Evaluation of proliferation of JAR cells treated with sEng by BrdU incorporation (A) and by MTT uptake (B).



**FIGURE 10:**

Evaluation of the invasion by JAr cells treated with sEng of Matrigel®-coated transwells .

We next analyzed the effect of sEng in the pseudo-vasculogenesis process in JAr cells. By this process the trophoblast cells changes its phenotype, reducing epithelial receptors and acquiring endothelial related receptors. Pseudo-vasculogenesis is associated with trophoblast invasiveness, which is necessary to the correct remodeling of spiral arteries. It has been demonstrated that the switching process is defective in pre-eclampsia, further suggesting its functional importance (Fisher, 2004; Zhou et al, 1997). We observed in sEng- treated JAr cells and placental explants reduced CD31 and increased E-cadherin expression, endothelial and epithelial cell receptors respectively (FIGURE 11). Our results suggest that pseudo-vasculogenesis process is impaired in the presence of sEng.



**FIGURE 11:**

Evaluation of pseudo-vasculogenesis process in JAr cells treated with sEng (A) and placental explants (B). Pseudo-vasculogenesis was assessed as the mRNA expression of CD31 (left panel) and *Ecad* (right panel).

From the results above described we can obtain the following conclusions:

- According to our *in vivo* results:
  1. The model of high plasma levels of human soluble endoglin described in this study reproduces many of the characteristics of preeclampsia.
  2. High plasma levels of soluble endoglin induce preeclampsia symptoms.
  3. High plasma levels of soluble endoglin contribute to other alterations present in women affected by preeclampsia such as oxidative stress, inflammation, soluble factors release and placental alterations.

- According to our *in vitro* results:
  1. Soluble endoglin reduces proliferation and invasion in trophoblast cells.
  2. Soluble endoglin reduces the pseudo-vasculogenesis process.
  3. Soluble endoglin modifies the trophoblastic functions required for an adequate placental vascular remodeling.

In summary, this work demonstrates that a high plasmatic level of soluble endoglin is not only a biomarker of prognostic and diagnostic of preeclampsia, but also plays an important role in the etiology and pathology of this disease

## REFERENCES

Akison LK, Nitert MD, Clifton VL, Moritz KM, Simmons DG (2017) Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. *Placenta*

Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C (2010) The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42: 1634-1650

Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC (2006) Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev Dyn* 235: 3280-3294

Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2004) Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biology of reproduction* 70: 1806-1813

Crovetto F, Figueras F, Triunfo S, Crispi F, Rodriguez-Sureda V, Peguero A, Dominguez C, Gratacos E (2014) Added value of angiogenic factors for the prediction of early and late preeclampsia in the first trimester of pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 35: 258-266

Chun D, Braga C, Chow C, Lok L (1964) Clinical Observations on Some Aspects of Hydatidiform Moles. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 71: 180-184

Dechend R, Luft FC (2008) Angiogenesis factors and preeclampsia. *Nature medicine* 14: 1187-1188

Duley L (2009) The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 33: 130-137

Eiland E, Nzerue C, Faulkner M (2012) Preeclampsia 2012. *J Pregnancy* 2012: 586578

Farina A, Sekizawa A, De Sanctis P, Purwosunu Y, Okai T, Cha DH, Kang JH, Vicenzi C, Tempesta A, Wibowo N, Valvassori L, Rizzo N (2008) Gene expression in chorionic villous

samples at 11 weeks' gestation from women destined to develop preeclampsia. *Prenat Diagn* 28: 956-961

Fisher SJ (2004) The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 53

Frank DB, Abtahi A, Yamaguchi DJ, Manning S, Shyr Y, Pozzi A, Baldwin HS, Johnson JE, de Caestecker MP (2005) Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. *Circulation research* 97: 496-504

Gilbert JS, Babcock SA, Granger JP (2007) Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. *Hypertension* 50: 1142-1147

Gilbert JS, Gilbert SA, Arany M, Granger JP (2009) Hypertension produced by placental ischemia in pregnant rats is associated with increased soluble endoglin expression. *Hypertension* 53: 399-403

Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dallenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, Lapaire O (2009) Potential markers of preeclampsia--a review. *Reprod Biol Endocrinol* 7: 70

Hod T, Cerdeira AS, Karumanchi SA (2015) Molecular Mechanisms of Preeclampsia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5

Lee KB, Folger JK, Rajput SK, Smith GW (2014) Temporal regulation of mRNAs for select bone morphogenetic proteins (BMP), BMP receptors and their associated SMAD proteins during bovine early embryonic development: effects of exogenous BMP2 on embryo developmental progression. *Reprod Biol Endocrinol* 12: 67

Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA (2006) Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *The New England journal of medicine* 355: 992-1005

Lopez-Novoa JM (2007) Soluble endoglin is an accurate predictor and a pathogenic molecule in pre-eclampsia. *Nephrol Dial Transplant* 22: 712-714.



Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation* 111: 649-658

Miriyala S, Gongora Nieto MC, Mingone C, Smith D, Dikalov S, Harrison DG, Jo H (2006) Bone morphogenetic protein-4 induces hypertension in mice: role of noggin, vascular NADPH oxidases, and impaired vasorelaxation. *Circulation* 113: 2818-2825

Nemeckova I, Serwaczak A, Oujo B, Jezkova K, Rathouska J, Fikrova P, Varejckova M, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Chlopicki S, Nachtigal P (2015) High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PLoS one* 10: e0119665

Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DJ (2012) Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech* 5: 9-18

Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, Wibowo N, Koide K, Okazaki S, Nakamura M, Okai T (2008) Evaluation of physiological alterations of the placenta through analysis of cell-free messenger ribonucleic acid concentrations of angiogenic factors. *American journal of obstetrics and gynecology* 198: 124 e121-127

Redman CW, Sacks GP, Sargent IL (1999) Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* 180: 499-506

Redman CW, Sargent IL (2003) Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta* 24 Suppl A: S21-27

Redman CW, Sargent IL, Staff AC (2014) IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia - two placental causes of preeclampsia? *Placenta* 35 Suppl: S20-25

Than NG, Romero R, Hillermann R, Cozzi V, Nie G, Huppertz B (2008) Prediction of preeclampsia - a workshop report. *Placenta* 29 Suppl A: S83-85

Troisi R, Braekke K, Harsem NK, Hyer M, Hoover RN, Staff AC (2008) Blood pressure augmentation and maternal circulating concentrations of angiogenic factors at delivery in

preeclamptic and uncomplicated pregnancies. American journal of obstetrics and gynecology 199: 653 e651-610

Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujo B, Langa C, Gonzalez-Nunez M, Llano E, Pendas AM, Diaz M, Castrillo A, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2012) Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. Circulation 126: 2612-2624

Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. Nature medicine 12: 642-649

Waddell BJ, Hisheh S, Dharmarajan AM, Burton PJ (2000) Apoptosis in rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. Biology of reproduction 63: 1913-1917

Wong WT, Tian XY, Chen Y, Leung FP, Liu L, Lee HK, Ng CF, Xu A, Yao X, Vanhoutte PM, Tipoe GL, Huang Y (2010) Bone morphogenic protein-4 impairs endothelial function through oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2 upregulation: implications on hypertension. Circulation research 107: 984-991

Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ (1997) Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? The Journal of clinical investigation 99: 2152-2164





---

ANEXOS

---